

VOGEL-HÄMOGLOBINE

Die Primärstrukturen der Hämoglobine
des adulten Felsenpinguins (*Eudyptes cretatus*)
und des adulten Kormorans
(*Phalacrocorax carbo*)

Das Tauchen aus molekularbiologischer Sicht

Korinna Huber

Disbui. München

1988



Aus dem
Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Abteilung Proteinchemie
Direktor: Prof. Dr. G. Braunitzer

und dem

Institut für Geflügelkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. J. Kösters

VOGEL - HÄMOGLOBINE

Die Primärstrukturen der Hämoglobine
des adulten Felsenpinguins (*Eudyptes cretatus*)
und
des adulten Kormorans (*Phalacrocorax carbo*)

*Das Tauchen aus
molekularbiologischer Sicht*

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Korinna Huber
aus
Heidelberg

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. J. Kösters

Korreferent: Prof. Dr. D.O. Schmid

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

1. Die Aufgabe ist zu lösen.

2. Die Aufgabe ist zu lösen.

3. Die Aufgabe ist zu lösen.

4. Die Aufgabe ist zu lösen.

5. Die Aufgabe ist zu lösen.

6. Die Aufgabe ist zu lösen.

7. Die Aufgabe ist zu lösen.

8. Die Aufgabe ist zu lösen.

9. Die Aufgabe ist zu lösen.

10. Die Aufgabe ist zu lösen.

11. Die Aufgabe ist zu lösen.

12. Die Aufgabe ist zu lösen.

13. Die Aufgabe ist zu lösen.

14. Die Aufgabe ist zu lösen.

15. Die Aufgabe ist zu lösen.

16. Die Aufgabe ist zu lösen.

17. Die Aufgabe ist zu lösen.

18. Die Aufgabe ist zu lösen.

19. Die Aufgabe ist zu lösen.

20. Die Aufgabe ist zu lösen.

21. Die Aufgabe ist zu lösen.

22. Die Aufgabe ist zu lösen.

23. Die Aufgabe ist zu lösen.

24. Die Aufgabe ist zu lösen.

25. Die Aufgabe ist zu lösen.

26. Die Aufgabe ist zu lösen.

27. Die Aufgabe ist zu lösen.

28. Die Aufgabe ist zu lösen.

29. Die Aufgabe ist zu lösen.

30. Die Aufgabe ist zu lösen.

31. Die Aufgabe ist zu lösen.

Meinen Eltern

Abkürzungen

ATP = Adenosintriphosphat
CM = Carboxymethyl
DC = Dünnschichtchromatographie
DPG = 2,3-Diphosphoglycerat
Hb = Hämoglobin
HU = Human
IPP = Inositolpentaphosphat
KO = Kormoran
Mb = Myoglobin
OPA = Orthophthaldialdehyd
PI = Pinguin
PITC = Phenylisothiocyanat
PCO₂ = CO₂-Partialdruck
PTH = Phenylthiohydantoin
P₅₀ = Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung
des Hämoglobins
Propin = 3-Diethylaminopropin
Quadrol = N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylen-
diamin
RP = Reversed Phase
Reagenz I = 1-(Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure,
Natriumsalz
Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,3,5-
trisulfonsäure, Trinatriumsalz
R = Reagent
S = Solvent
T = Temperatur
TPCK = (N-Tosyl-L-Phenylalanyl)chloromethan:
Blockierung der chymotryptischen Aktivität
des Trypsins
Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Aminosäureabkürzungen im Drei-Buchstaben-

beziehungsweise Ein-Buchstaben-Code

Alanin	= Ala = A
Arginin	= Arg = R
Asparagin	= Asn = N
Asparaginsäure	= Asp = D
Cystein	= Cys = C
Glutamin	= Gln = Q
Glutaminsäure	= Glu = E
Glycin	= Gly = G
Histidin	= His = H
Isoleucin	= Ile = I
Leucin	= Leu = L
Lysin	= Lys = K
Methionin	= Met = M
Phenylalanin	= Phe = F
Prolin	= Pro = P
Serin	= Ser = S
Threonin	= Thr = T
Tryptophan	= Trp = W
Tyrosin	= Tyr = Y
Valin	= Val = V

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Allgemeiner Teil.....	3
2.1. Hämoglobin: Struktur und Funktion.....	3
2.2. Physiologie des Tauchens.....	8
3. Material und Methoden.....	16
3.1. Rohmaterial.....	16
3.1.1. Gewinnung und Aufarbeitung des Blutes.....	16
3.1.2. Hämolyse.....	16
3.1.3. Hämabspaltung.....	17
3.2. Elektrophoresen.....	18
3.2.1. Gelelektrophoresen.....	18
3.2.2. Dünnschichtelektrophorese.....	19
3.3. Komponententrennung.....	20
3.4. Kettentrennungen.....	22
3.4.1. Ionenaustauschchromatographie.....	22
3.4.1.1. Kettentrennung Pinguin.....	22
3.4.1.2. Kettentrennung Kormoran.....	23
3.4.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	24
3.4.2.1. Kettentrennung Pinguin.....	24
3.4.2.2. Kettentrennung Kormoran.....	25
3.5. Oxidation.....	26
3.6. Spaltung der Globinketten.....	27
3.6.1. Enzymatisch.....	27
3.6.2. Chemisch.....	28
3.7. Isolierung der Spaltprodukte.....	28
3.7.1. Gelfiltration.....	28
3.7.1.1. von tryptischen Peptiden.....	28
3.7.1.2. von hydrolytischen Spaltprodukten.....	28
3.7.2. Blockierung des N-Terminus.....	29
3.7.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	29
3.7.3.1. Trennung von Peptidgemischen.....	29
3.7.3.2. Trennung hydrolytischer Spaltprodukte.....	30

3.8. Analysen.....	31
3.9. Sequenzierung.....	31
3.9.1. Flüssigphasen-Sequenator.....	31
3.9.2. Gasphasen-Sequenator.....	32
3.9.3. Identifikation der Aminosäuren.....	33
4. Ergebnisse.....	34
4.1. Komponenten und Ketten.....	34
4.1.1. Komponenten.....	34
4.1.1.1. Pinguin.....	34
4.1.1.2. Kormoran.....	35
4.1.2. Ketten.....	35
4.1.2.1. Pinguin.....	36
4.1.2.2. Kormoran.....	36
4.2. Kettentrennungen.....	37
4.2.1. Pinguin.....	37
4.2.2. Kormoran.....	38
4.3. Analysen.....	40
4.4. Sequenzierung.....	41
4.5. Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide der α -Ketten.....	41
4.5.1. Pinguin α -Ketten.....	42
4.5.2. Kormoran α A-Ketten.....	43
4.5.3. Kormoran α D-Ketten.....	44
4.6. Tryptische Spaltung und Isolierung der Peptide der β -Ketten.....	45
4.6.1. Pinguin β -Ketten.....	46
4.6.2. Kormoran β -Ketten.....	51
4.7. Chemische Spaltung der Asp-Pro - Bindung der β -Ketten.....	54
4.7.1. Trennung der Spaltprodukte - Pinguin.....	54
4.7.1.1. mittels HPLC über LiChrosorb RP2 Material.....	54
4.7.1.2. mittels Blockierung des N- Terminus durch OPA (Orthophthaldialdehyd).....	55
4.7.1.3. mittels Gelfiltration über eine Sephadex G-50 fine Säule.....	56

4.7.2. Trennung der Spaltprodukte - Kormoran.....	56
4.7.2.1. mittels HPLC über Nucleosil C4 Material...	56
4.7.2.2. mittels Gelfiltration über eine Sephadex G-50 fine Säule.....	57
4.8. Anhang: Bruttotabellen und Sequenzen	
von Pinguin.....	58
und Kormoran.....	60
5. Diskussion.....	64
5.1. Grundlagen.....	64
5.2. Felsenpinguin.....	69
5.2.1. Biologie des Felsenpinguins.....	69
5.2.2. Sequenzanalyse.....	70
5.2.3. Physiologische Daten.....	73
5.3. Kormoran.....	76
5.3.1. Biologie des Kormorans.....	76
5.3.2. Hämoglobinkomponenten - Das Auftreten des Hb D's bei Vögeln.....	77
5.3.3. Sequenzanalyse.....	79
5.3.4. Schlußfolgerung.....	85
5.3.5. Physiologische Daten.....	86
5.4. Anpassung an extreme Umweltbedingungen - TAUCHEN.....	87
6. Zusammenfassung.....	88
6.1. Die Hämoglobine zweier Tauchvögel.....	88
6.2. Summary.....	89
6.3. Sumario.....	90
7. Literaturverzeichnis.....	91



1. Einleitung

Formen und Mechanismen der Anpassung der Tiere an bestimmte Lebensräume und Umweltbedingungen zu erklären, ist seit langem das Ziel vieler Biologen, Physiologen und Verhaltensforscher. Für die Deutung wurde von morphologischen und physiologischen Eigenschaften der jeweils untersuchten Tiergruppe ausgegangen. Seit neuerer Zeit wird nun mehr und mehr auch die Molekularbiologie zur Untersuchung von Anpassungsphänomenen herangezogen.

Das im Rahmen vieler Arbeiten untersuchte *Hämoglobin* erscheint besonders geeignet, da es im Tierreich weit verbreitet ist und somit auch vergleichende Untersuchungen zuläßt. Da die Sauerstoffversorgung des Organismus über das Hämoglobin auch unter hypoxischen Bedingungen eine Lebensnotwendigkeit ist, lag die Vermutung nahe, daß eine Anpassung auch auf molekularer Ebene stattgefunden haben könnte. So konnte zum Beispiel die Höhenatmung des Lamas auf Grund der besonderen Primärstruktur des Hämoglobins von Braunitzer et al.(1978) aufgeklärt werden.

In dieser Arbeit soll das Phänomen des Tauchens bei Vögeln untersucht werden:

Es werden die Primärstrukturen der Hämoglobine zweier Tauchvögel (Pinguin, Kormoran) ermittelt. Beide Vögel sind optimal an das Leben im und am Wasser angepaßt, zeigen ein ausgeprägtes Tauchverhalten und erscheinen daher geeignet für diese Untersuchungen.

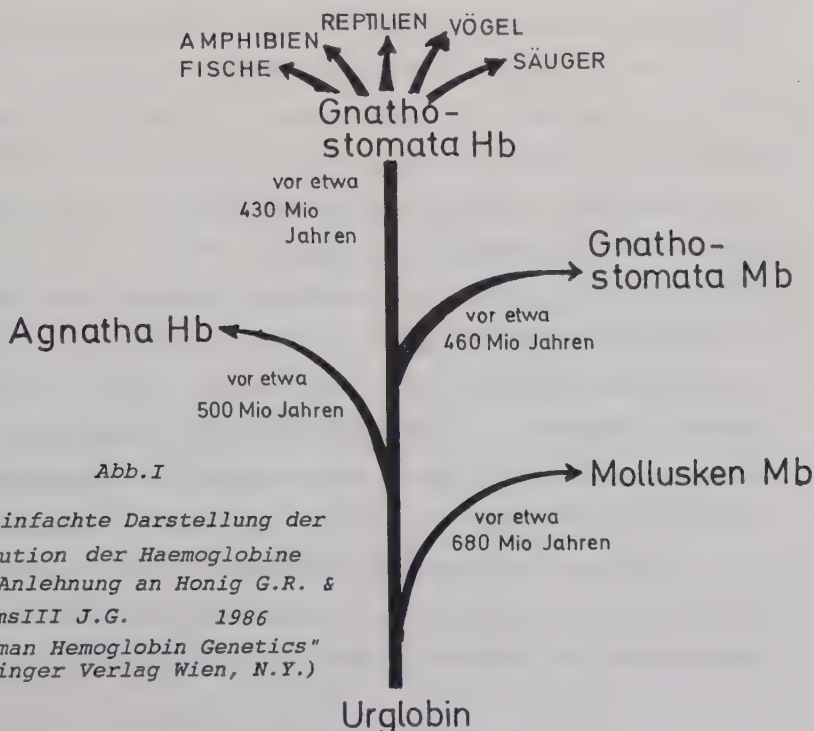
Es soll versucht werden, anhand der Unterschiede (Substitutionen) zwischen den Primärstrukturen der Vogelhämoglobine und des Humanhämoglobins auf Veränderungen der Gesamtstruktur der Vogelhämoglobine zu schließen. Ob diese dann zu einer Funktionsänderung führen, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Diesen strukturellen Betrachtungen liegt das Röntgenstrukturmodell des Humanhämoglobins von M.F.Perutz (1960) zu Grunde. Auf diese Weise soll untersucht werden, ob diese Vögel ihre Tauchfähigkeit (= Toleranz hypoxischer Zustände) - neben den physiologischen Anpassungserscheinungen (s.2.2.) auch aus einer besonderen Eignung des Hämoglobins schöpfen.

Zu diesem Zweck werden die Sequenzen der Tauchvögel auch mit denen der nichttauchenden Vögel verglichen.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Hämoglobin: Struktur und Funktion

Hämoglobin ist ein komplexes tetrameres Molekül mit einem Molekulargewicht von 64500, welches sich nach Honig & Adams (1986) entwicklungsgeschichtlich von einem globinähnlichen Hämprotein herleitet. Durch Duplikation des Genes dieses "Urglobins" entwickelten sich divergent das Myoglobin und Vorläufer des Hämoglobins, aus denen durch weitere Genduplikationen schließlich die heutigen individuellen Hämoglobintypen mit ihren spezifischen Reaktionen auf allosterische Effektoren entstanden. Hämoglobine sind nach Bunn (1986) bei allen Vertebraten, einigen Avertebraten und Pflanzen als "respiratorisches" Molekül zu finden.



Über die Struktur und Funktion des Hämoglobins wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht: Neben den zentralen Abhandlungen von M.F.Perutz (1960, 1968, 1969, 1983) wurden von Dickerson & Geis (1983) die Zusammenhänge von Struktur und Funktion besonders deutlich dargestellt. Im folgenden werden die wichtigsten Kriterien der Eigenschaften des Hämoglobins zusammengefaßt. Das Hämoglobin der Säuger und Vögel besteht aus vier Polypeptidketten, von denen je zwei identisch sind ($\alpha_2\beta_2$). Die α -Ketten sind aus 141, die β -Ketten aus 146 Aminosäureresten aufgebaut. Ihre Primärstruktur bestimmt die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Moleküls. Die Sekundärstruktur jeder Kette besteht aus helikalen (A - H) und nicht helikalen Bereichen (AB - GH), deren Faltung zum globulären Molekül (Tertiärstruktur) durch Wasserstoffbrücken, Salzbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen erreicht und stabilisiert wird.

Die Untereinheiten, die isoliert dem Myoglobin (153 Aminosäuren) in Struktur und Funktion ähneln, sind miteinander durch zahlreiche Bindungsstellen ($\alpha_1\beta_1$ / Dimere; $\alpha_1\beta_2$ / Tetramere) zur Quartärstruktur verbunden.

Jede Untereinheit bindet ein Häm-molekül bestehend aus einem Porphyrinringsystem und einem zentralen Eisenatom, welches über die Kontaktstelle α/β F 8 His komplex mit der Polypeptidkette verbunden ist. Diese prosthetische Gruppe ist im Zusammenwirken mit den Proteinketten für die Sauerstoffbindungsfähigkeit verantwortlich; pro Molekül Hämoglobin können vier Moleküle Sauerstoff gebunden werden. Daß die Funktion des Häms durch die umgebende Polypeptidkette gesteuert wird, ist daraus ersichtlich, daß das Häm in vielen

anderen Chromoproteiden andere Funktionen hat, wie zum Beispiel im Cytochrom als Elektronencarrier (Stryer 1983).

Das Hämoglobin tritt in zwei Konformationen auf: Der sauerstoffbeladenen Oxy- oder R-(relaxed) Form und der sauerstofffreien Deoxy- oder T-(tensed) Form. Der Übergang von der einen in die andere Form ist mit einer Verschiebung der Untereinheiten gegeneinander verbunden. In der Oxy- Form wird durch ein Auseinanderweichen der Untereinheiten und die Anordnung des Eisenatoms in der Ebene des Hämmoleküls der Zugang und die Bindung des Sauerstoffs erleichtert. In der Deoxy- Form wird durch Verdichtung der Struktur (Ausbildung von Salzbrücken) und die Bewegung des Eisenatoms aus der Ebene des Häms eine Aufnahme von Sauerstoff behindert.

Diese Konformationsänderung wird durch allosterische Effektoren wie anorganische Phosphate, H^+ - und Cl^- - Ionen und CO_2 beeinflusst. Während nach Benesch & Benesch (1969) bei adulten Säugern vorwiegend 2,3 - Diphosphoglycerat (DPG) auftritt, spielen nach Gersonde & Ganguly (1986) bei adulten Vögeln neben anderen Polyphosphaten (Borgese et al. 1977) Inositolpentaphosphat (IPP) und bei adulten Fischen Adenosintriphosphat (ATP) für die Regulation der Sauerstoffaffinität eine große Rolle. Durch Einlagerung der anorganischen Phosphate in den Phosphatbindungsbereich der β - Ketten wird nach Dickerson & Geis (1983) die Deoxy- Form stabilisiert, die Sauerstoffaffinität sinkt. Über die Konzentration allosterischer Effektoren im Gewebe kann also neben anderen Regelmechanismen physiologischer Art auch eine Anpassung an hypoxische Umweltbedingungen stattfinden. Nach

Heath (1981) erhöht sich zum Beispiel beim Menschen der DPG-Spiegel drastisch, wenn er sich für einige Zeit in höheren Regionen (4000 m) aufhält. Eine andere Form der Anpassung an Sauerstoffmangel findet man nach Braunitzer et al. (1978) beim Hb F des menschlichen Foetus, das nur schlecht in der Lage ist, DPG zu binden: Die Sauerstoffaffinität wird dadurch höher als die des maternalen Hb A, sodaß ein Affinitätsgefälle Richtung Foetus auftritt und eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet ist.

H^+ -, Cl^- - Ionen und CO_2 bewirken ebenfalls eine Stabilisierung der Deoxy- Form und senken die Sauerstoffaffinität, was im Gewebe die Abgabe des Sauerstoffs und den Abtransport des CO_2 sicherstellt. Das CO_2 wird nicht nur als CO_2 transportiert, sondern reagiert teilweise auch mit H_2O zu HCO_3^- und H^+ , wobei die Bikarbonationen als Puffer im Blut wirken und die H^+ - Ionen am Hämoglobin gebunden zur Lunge transportiert werden (s. Bohreffekt). Dort kann durch den umgekehrten Vorgang H_2O und CO_2 abgeatmet werden.

Der Einfluß der H^+ - Ionen, also letztlich des pH- Wertes des Gewebes wird nach Chr.Bohr (1904) als Bohreffekt bezeichnet: Vor allem β His 146, α His 122 (Russu et al. 1986) und die terminalen Aminogruppen sind in der Lage, H^+ - Ionen aufzunehmen. Die dadurch entstehenden Ladungsänderungen der Seitenketten führen zur Ausbildung zusätzlicher Wechselwirkungspositionen, die die Deoxy- Form stabilisieren.

In der Lunge verschiebt sich durch den Überschuß an Sauerstoff das Gleichgewicht in Richtung der Oxy- Form, wobei die allosterischen Effektoren wieder freierwerden.

Der Sauerstofftransport ist im Laufe der Evolution durch verschiedene Mechanismen optimiert worden:

- Durch Kompartimentierung des Hämoglobins in den Erythrozyten wurde eine Vervielfachung der Transportkapazität erreicht.
- Durch Reaktion auf die verschiedenen allosterischen Effektoren wurde eine gesteigerte Effizienz der Sauerstoffbe- und entladung erzielt.
- Durch Interaktion der Untereinheiten:
Kooperativität

Die Untereinheiten stehen über die Konformationsänderung bei Sauerstoffbeladung miteinander in Kontakt. Die Bindung des ersten und jedes weiteren Sauerstoffmoleküls begünstigt die Oxigenierung. Die Sauerstoffbindungskurve zeigt deshalb eine sigmoide Form im Gegensatz zum monomeren Myoglobin, dessen Bindungskurve hyperbolisch verläuft. Die Steigung der Tangente im Wendepunkt der Kurve gibt den Grad der Kooperativität (d.h. die Geschwindigkeit, mit der weitere Sauerstoffmoleküle gebunden werden) an. Dieser Faktor wird nach A. Hill (1913) Hillkoeffizient genannt. Phosphateinfluss verschiebt die Kurve nach rechts, da die Sauerstoffaffinität sinkt, der Halbsättigungswert P_{50} steigt.

2.2. Physiologie des Tauchens

Das Tauchverhalten bei tauchenden Säugern und Vögeln hat die Wissenschaft, insbesondere die Physiologie und später auch die Biochemie, schon sehr früh interessiert. Bereits im letzten Jahrhundert wurde von P.Bert (1870) (siehe Andersen 1966) eine erste Arbeit veröffentlicht, die systematische Studien über das Tauchen enthielt. Unter anderem stellte Bert fest, daß das Blutvolumen in Relation zum Körpergewicht bei Tauchern (Enten) größer ist als bei Nichttauchern (Huhn). Die Untersuchungen in den nächsten Jahren wurden zum einen an Robben, Walen und Delphinen, zum anderen an Enten und Pinguinen durchgeführt. Diese Meeressäuger und Tauchvögel sind alle durch ein gutes Tauchvermögen gekennzeichnet und konnten oft auch in Gefangenschaft zu Tauchversuchen konditioniert und eingesetzt werden. 1894 setzte der französische Physiologe Ch. Richet (siehe Andersen 1966) die Beobachtung an tauchenden Vertebraten fort und erkannte, daß die aufgenommene Sauerstoffmenge bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch nicht für einen längeren Tauchgang ausreichen konnte. Er stellte zusammen mit P.Langlois durch Lungengasanalysen fest, daß der Sauerstoffverbrauch während des Tauchens sank. Daraus schloß er, daß die Sauerstoffverbrennung im Gewebe herabgesetzt sein mußte. Zur selben Zeit postulierte C.Bohr (siehe Andersen 1966), daß eine Zunahme des anaeroben Stoffwechsels Energie liefern sollte.

Im Jahre 1913 erschienen dann gleich mehrere Arbeiten von verschiedenen Autoren zu diesem Thema: F.M.Huxley & N.Paton (siehe Andersen 1966) fanden heraus, daß die Apnoe nach

dem Untertauchen reflexartig eintrat, bedingt durch die Tauchhaltung. Neben der Apnoe stellte sich eine ausgeprägte Bradykardie während des Tauchens ein. T.Koppanyi & N.Kleitman (siehe Andersen 1966) ergänzten dazu, daß die Apnoe - über Reflexbahnen - auch durch das Naßwerden der Kopfschleimhäute, insbesondere der Nasenschleimhäute, ausgelöst wurde. Schließlich wurde von J.B.Orr & A.Watson (siehe Andersen 1966) erstmals eine Studie der Blutgase und des Laktatspiegels bei Tauchvögeln (Enten) durchgeführt. Die Autoren zogen damals den falschen Schluß, daß die Atmung beim Tauchen durch Kohlendioxid inhibiert wird und nicht stimuliert wie bei den terrestrischen Tieren.

In den Jahren 1934-40 erschienen weitere umfassende und grundlegende Arbeiten über das Phänomen des Tauchens aus physiologischer Sicht; mehreren Arbeiten von L.Irving (siehe Andersen 1966, Irving 1939) folgten 1940 experimentelle Untersuchungen über die respiratorischen Funktionen von tauchenden Säugern und Vögeln von P.F.Scholander. Auf der Grundlage dieser und der vorherigen Arbeiten wurden im Zeitraum von 1940-70, hauptsächlich von H.T.Andersen (1959, 1961, 1966), Andersen & A.Lovo (1964, 1967), G.L.Kooyman & Andersen (1969) und Cl.Lenfant (1969) ergänzende und weiterführende Untersuchungen vorgenommen und veröffentlicht.

Aus diesen Studien können zusammenfassend folgende zentrale Aussagen für das Tauchen gemacht werden:

I. Kreislaufregulation:

Mit dem Eintauchen des Tieres treten reflektorisch ver-

schiedene Regulationsmechanismen in Kraft. Zentral entwickelt sich eine vegetativ stimulierte Bradykardie, während der die Frequenzwerte unter die Hälfte der Normalwerte (von 110 auf 20 Schläge/min bei Enten) sinken. Damit sinkt der Eigenbedarf des Herzens an Sauerstoff auf bis zu 10 % des Ruhebedarfs. Je früher und ausgeprägter die Bradykardie einsetzt, desto länger kann das Tier tauchen. Jungtiere (z.B. junge Robben) brauchen erst eine gewisse Trainingsphase, bevor sie das Tauchvermögen ihrer Eltern entwickelt haben. Die Herzfrequenzsenkung bleibt auch unbeeinflusst von Muskelaktivitäten wie zum Beispiel durch das Fangen von Beute. Peripher entwickelt sich eine Einschränkung der Blutversorgung, sodaß alle Organe und Gewebe, die gegen hypoxische Zustände und deren Folgen unempfindlicher sind (v.a. das Muskelgewebe), teilweise oder völlig aus der Zirkulation genommen werden. Herz und Gehirn als hypoxie-anfälligste Organe werden normal versorgt. Durch die Gefäßbahnverengung vertieft sich auch die Bradykardie, da der erhöhte Widerstand der Strombahn reflektorisch zur Herzfrequenzsenkung führt. Mit diesen Regelmechanismen spart der Organismus einen wesentlichen Teil des Sauerstoffs ein.

II. Stoffwechselregulation:

Eng verbunden mit der Regulation des Kreislaufs entwickelt sich eine Reduktion des Stoffwechsels im Organismus, da der aufgenommene Sauerstoff nicht für einen längeren Tauchgang bei gleichbleibender Stoffwechselrate ausreicht. Der Sauerstoffverbrauch/min wird bei steigender Tauchlänge immer ge-

ringer. Auch Muskelaktivität bewirkt keinen Mehrverbrauch. In den von der Zirkulation isolierten Geweben (v.a. den Muskeln) findet vermehrt anaerober Stoffwechsel statt, wobei aber die gewonnene Energie nur bei reduzierter Stoffwechselrate ausreichen würde.

So spart der Organismus Sauerstoff und Energie.

III. Sauerstoffspeicher:

Speichern kann der Organismus den Sauerstoff in den Lungen, im Blut und im Gewebe.

Bei den Tauchsäugetern und -vögeln ist die Lunge nur ein Speicher von geringer Kapazität, da die Tiere in der Regel vor dem Untertauchen ausatmen. Bei den Tauchvögeln ist sie etwas größer, da der Lunge die Luftsäcke angegliedert sind. Dennoch sind die Vögel wesentlich schlechtere Taucher als die Meeressäuger.

Die Menge des im Blut gespeicherten Sauerstoffs hängt vom Blutvolumen, der Erythrozytenzahl und deren Hämoglobingehalt ab. Die Sauerstoffkapazität des Blutes ist aber bei den Tauchsäugetern und -vögeln nicht immer höher als bei terrestrischen Tieren. Auch während des Tauchens ändern sich die Kapazitätswerte nicht.

Im Gewebe dient das Myoglobin als Sauerstoffspeicher. Bei tauchenden Tieren ist die Muskulatur häufig sehr dunkel, was auf einen hohen Myoglobingehalt hinweist. Der hier gebundene Sauerstoff ist ausschließlich für das umliegende Gewebe verwendbar. Der P_{50} des Myoglobins liegt bei 3.26 mm Hg, der

des Hämoglobins bei 30 mm Hg, das heißt, die Sauerstoffaffinität des Myoglobins ist um das zehnfache höher als die des Hämoglobins. Eine Abgabe von Sauerstoff an das Hämoglobin ist also nicht möglich. Da die Muskulatur - wie oben beschrieben - aus der Zirkulation herausgenommen ist, kann auch kein Sauerstoff vom Hämoglobin an das Myoglobin abgegeben werden. Der Sauerstoffvorrat des Myoglobins wird in den ersten Tauchminuten verbraucht, der Stoffwechsel wird auf anaerobe Wege umgestellt. Nach Einspielen der regulatorischen Maßnahmen entscheidet letztlich die Sauerstoffspeicherkapazität des Organismus über die Tauchdauer; sinkt der Sauerstoffgehalt unter 2 - 3 %, besteht für das Tier Lebensgefahr.

IV. Verhalten von Sauerstoff/Kohlendioxid, Laktat und pH-Wert:

Während der Sauerstoffgehalt der Speicher anfangs stärker, später langsamer absinkt (am Ende des Tauchganges ist der Sauerstoffverbrauch/min auf 5 % des Ruhewertes abgesunken), steigt in gleichem Maße der Kohlendioxidgehalt an. Kohlendioxid löst bei tauchenden Tieren nicht - wie früher angenommen wurde - eine Inhibition der Atmung aus, sondern stimuliert sie genauso wie bei den terrestrischen Tieren. Allerdings liegt bei jenen die Kohlendioxidtoleranz höher, Werte bis 15 % werden ohne Gefahr ertragen.

Der Laktatspiegel im Blut steigt während des Tauchens nicht wesentlich an, da der Bildungsort, die Muskulatur, isoliert ist. Im Muskel erhöht sich der Laktatspiegel aber zunehmend,

es stellt sich eine metabolische Azidose ein.

Der pH-Wert fällt sowohl im Blut wie im Gewebe ab, es bildet sich eine zunehmende respiratorische Azidose im Blut aus.

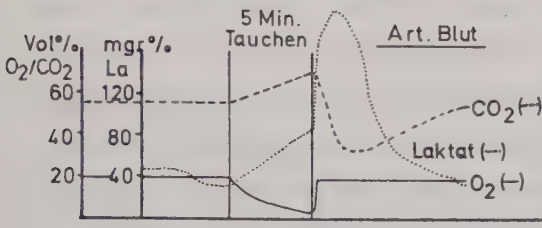


Abb. II

Wechsel der Laktat-, CO_2 - und O_2 - Spiegel im artefiziellen Blut des Pinguins vor, während und nach dem Tauchen nach Scholander P.F. (1940) Halvr. Skrifter Norske-Videnskap Akad. Oslo 22, 5-121

V. Erholungsphase:

Sobald das Tier wieder aufgetaucht ist, setzt eine frequente Atmung ein, die das Sauerstoffdefizit ausgleichen muß. Gleichzeitig fällt der Kohlendioxidspiegel wieder ab, wobei kurzzeitig sogar Werte unter dem normalen Ruhewert erreicht werden.

Am signifikantesten ist die plötzliche hohe Laktatanflutung, da nach dem Auftauchen die peripheren Gefäßbahnen wieder geöffnet werden. Während der weiteren Erholungsphase wird das Laktat in Leber, Niere und Herz abgebaut.

Der pH-Wert sinkt mit dem Anfluten des Laktats zunächst stark ab, was eine kompensatorische Zunahme der Blutbasen (Bikarbonate) zur Folge hat. Die metabolische Azidose im Blut wird so wirksam abgepuffert. Entscheidend für aufeinanderfolgende Tauchgänge ist die Qualität der dazwischenliegenden Erholungsphasen. Je schneller die Ruhewerte wieder erreicht sind, desto rascher kann erneut getaucht werden.

VI. Tieftauchen:

Beim Tauchen in größere Tiefen müssen die Tiere noch ein weiteres Problem bewältigen, den Stickstoff. Durch den steigenden Druck mit zunehmender Tiefe (1 atm/ 10 m) wird vermehrt Stickstoff aus der eingeatmeten Luft im Blutplasma gelöst. Beim Auftauchen perlt der gelöste Stickstoff wieder aus und kann so als Embolus Gefäße verstopfen. Beim Menschen ist dies als Taucherkrankheit oder Caisson'sche Krankheit bekannt. Im Gegensatz zum Tier atmet der Mensch aber ständig durch ein Sauerstoffgerät, wenn er in größeren Tiefen taucht, nimmt also bei jedem Atemzug neuen Stickstoff auf, der resorbiert und im Blut gelöst wird. Die tauchenden Tiere atmen dagegen nur einmal ein, oft atmen sie vor dem Untertauchen sogar aus. Vor allem die Meeressäuger wie Wale und manche Robbenarten tauchen in Tiefen bis 300 m, ohne beim Auftauchen Störungen zu zeigen. Auch unter den Vögeln gibt es gute Tieftaucher, wie zum Beispiel die Eisente (*Clangula hyemalis*).

Neben der begrenzten Stickstoffaufnahme sind auch noch anatomische Besonderheiten günstig für die Tiere: So haben die Meeressäuger einen sehr flexiblen Thorax, der bei steigendem Druck immer mehr abgeflacht werden kann. Die Lunge wird dabei stark komprimiert, sodaß der lufthaltige Raum auf den Totraum beschränkt ist. Die Alveolarwände verdicken sich zunächst und kollabieren schließlich vollständig. So wird wirksam eine Stickstoffresorption verhindert.

All diese Regelmechanismen bedeuten aber nicht, daß ein tauchendes Tier vor der Taucherkrankheit immer geschützt

ist. Bringt man ein Meeressäuger tier gewaltsam in große Tiefen, wird es beim Auftauchen alle Symptome der Caisson'schen Krankheit aufweisen.

Tauchende Säuger und Vögel haben aber keine besonderen physiologischen Mechanismen entwickelt, sondern nur die auch bei terrestrischen Tieren bestehenden vervollkommenet. Können sich vor dem Tauchen die Regelmechanismen des Kreislaufs und Stoffwechsels nicht in ausreichendem Maße ausbilden, kann auch ein tauchendes Tier nicht länger unter Wasser existieren als ein terrestrisches.

In den letzten Jahren von 1970 bis zur Gegenwart erschienen noch einige Untersuchungsberichte über Probleme der tauchenden Vertebraten, wobei sich aber der Schwerpunkt der Betrachtungen auf die biochemischen Zusammenhänge verlegt hat.

3. Material und Methoden

3.1. Rohmaterial:

3.1.1. Gewinnung und Aufarbeitung des Blutes

Das Pinguinblut wurde drei Exemplaren der Gattung *Eudyptes crestatus* aus dem Tierpark Hellabrunn, München im Institut für Geflügelkrankheiten, LMU München, Oberschleissheim aus einer Fußrückenvene entnommen. Zur Vermeidung der Gerinnung wurde dem Blut Vetren 200 (Promonta) (= 200 I.E. Heparin/2 ml) zugesetzt.

Das Kormoranblut stammte von einem Wildvogel der Gattung *Phalacrocorax carbo*, der im Ismaninger Stausee bei München verunglückt aufgefunden worden war. Aus der Flügelvene wurde im Institut für Geflügelkrankheiten, LMU München, Oberschleissheim Blut entnommen, das ebenfalls mit Vetren 200 versetzt wurde.

Zur Gewinnung der Erythrozyten wurde das Blut in Eppendorfgläsern mit 12000 g zentrifugiert und das überstehende Serum verworfen. Die Erythrozyten wurden 3 x mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und bei -70°C eingefroren.

3.1.2. Hämolyse

Die Erythrozyten wurden mit dem gleichen Volumen Aq.bidest. 3 h lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ hämolysiert. Die Zellmembranen wurden abzentrifugiert und 3 x mit Aq.bidest. zur Entfernung von noch anhaftendem Hämoglobin nachgewaschen.

Zur Entfernung der Lipide wurde die Hämoglobininlösung mit Tetrachlorkohlenstoff geschüttelt und zentrifugiert. Die überstehende Hämoglobininlösung wurde abpipettiert und weiterverarbeitet.

3.1.3. Hämabspaltung

Zur Gewinnung des Rohglobins wurde nach der Methode von Rossi-Fanelli et al.(1958) verfahren: Die Hämoglobinlösung wurde langsam in salzsaures Aceton (Aceton + 1% HCl konz.) bei -20°C eingetropft. Das Globin fällt als weißer Niederschlag aus, das Häm bleibt in Lösung. Nach dem Abnehmen des überstehenden Acetons wurde das Globin noch mehrfach mit gekühltem reinem Aceton nachgewaschen und abzentrifugiert, um Hämreste zu entfernen. Das gereinigte Globin wurde in Aq.bidest. aufgenommen, die Lösung mittels Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend lyophilisiert. Das gewonnene Material wurde im Dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2. Elektrophoresen

3.2.1. Gelelektrophoresen

Alle Gelelektrophoresen wurden in Polyacrylamidrundgelen (5 x 75 mm, vertikal) durchgeführt.

3.2.1.1. Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophorese in Anlehnung an die Methode nach Davis (1964) ermöglichte es, eine Trennung der Hämoglobin-komponenten im nativen Zustand durchzuführen.

Gelzusammensetzung:

10 % Acrylsäureamid/Bisacrylsäureamid

0.4 M Tris/HCl-Puffer, pH 8.9

Starter Ammoniumperoxodisulfat

Elektrodenpuffer:

0.07 M Tris/Glycin-Puffer, pH 8.3

20 - 40 µl (10 - 20 µg) der mit Saccharose beschwerten Proben (Hämoglobinlösung) wurden auf die Gele aufgetragen. Nach einer Konzentrierung der Proben für 5 min bei 1 mA pro Gel wurde die Elektrophorese für 60 min mit 4,5 mA pro Gel durchgeführt.

Die gewanderten Proteinbanden wurden mit 1 %igem Amidoschwarz in 7 %iger Essigsäure für 15 min fixiert und irreversibel angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde mit 7 %iger Essigsäure ausgekocht.

3.2.1.2. Triton-Elektrophorese

Mittels der unter denaturierenden Bedingungen laufenden Triton-Elektrophorese nach der Methode von Rovera et al. (1978) wurde eine analytische Aufspaltung der Globinketten erreicht.

Gelzusammensetzung:

12 % Acrylsäureamid/Bisacrylsäureamid
 8 M Harnstoff
 5 % Essigsäure konz.
 2 % Triton X 100
 Starter Ammoniumperoxosulfat

Mit 5 %iger Essigsäure als Elektrophoresepuffer wurde zur Reinigung der Gele eine Vorelektrophorese für 60 min bei 200 V durchgeführt.

Probenpuffer:

8 M Harnstoff
 8 % Essigsäure konz.
 8 % Mercaptoäthanol

Von den im Probenpuffer aufgenommenen Proben wurden 20 - 40 µl (10 - 20 µg) auf die Gele aufgetragen und 180 min bei 140 V elektrophoretisch getrennt.

Fixierung und Färbung erfolgte wie in Absatz 3.2.1.1. beschrieben.

3.2.2. Dünnschichtelektrophorese

Anhand der Dünnschichtelektrophorese wurde unter anderem die Reinheit von HPLC - Fraktionen untersucht.

Trägermaterial:

DC - Cellulose - Fertigplatten
 Schichtdicke 0.1 mm, Merck
 ohne Fluoreszenzindikator

Von den in der Regel in 0.1 M Essigsäure aufgenommenen Proben wurden 1 - 2 nmol an der Startlinie möglichst kleinflächig getüpfelt und mit dem Fön getrocknet.

Elektrophoresepuffer:

5 % Pyridin

5 % Aceton

mit Essigsäure konz. auf pH 5.4

Nach dem Auftragen und Trocknen der Proben wurden die Platten gleichmäßig mit dem Puffer besprüht und in die wassergekühlte Elektrophoresekammer horizontal eingebracht. Nach einer Laufzeit von 90 min. bei 450 V und 12 - 15 mA wurden die Platten bei +80°C getrocknet und die Peptide mit Ninhydrinlösung blau angefärbt (10 min bei +80°C entwickeln).

Zur Identifizierung von Peptiden mit Tyrosin oder Histidin wurden die Platten nach dem Abzeichnen mit diazotierter Sulfanilsäure besprüht (Rotfärbung).

3.3. Komponententrennung

Neben der Disk-Elektrophorese konnten die Hämoglobinkomponenten sehr viel genauer durch die *Schnelle Protein Flüssigkeitschromatographie* (FPLC) mittels Ionenaustauscher bestimmt werden, wie es 1985 von Duppel beschrieben wurde.

Verwendete Säule:

Kationenaustauscher TSK SP 5 PW,
8 x 75 mm, LKB
mit Propylsulfonsäureresten als
Austauschergruppen

Apparatur:

Zweikolbenpumpe (2150 HPLC Pump, LKB)
Controller (2152 LC Controller, LKB)
Photometer (UV Detector BT 3030, Biotronik)
Schreiber (C R2AX, Shimadzu)

Puffer:

Puffer A: 0.01 M Natriumdihydrogenphosphat pH 4.91
0.01 M Dinatriumhydrogenphosphat pH 9.64
durch Mischung wurden verschiedene
pH-Werte eingestellt

Puffer B: = Puffer A + 1.0 M NaCl

Durchflußgeschwindigkeit: 0.5 ml/min

Abzentrifugierte und gegen Puffer A dialysierte (NaCl-Entfernung) Hämoglobinlösung wurde mit Puffer A so verdünnt, daß $125 \mu\text{g} = 100 \mu\text{l}$ auf die Säule aufgetragen werden konnten. Die Trennung erfolgte durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten, wodurch die Komponenten je nach ihrer positiven Ladung eluiert wurden. Bei pH 7.0 konnte eine hinreichende Trennung erzielt werden. Die Detektion erfolgte bei 280 nm, die Identifizierung wurde elektrophoretisch durchgeführt.

3.4. Kettentrennungen

3.4.1. Ionenaustauscher-Chromatographie

3.4.1.1. Kettentrennung PINGUIN

Die Kettentrennung wurde nach dem Ionenaustauscher-Prinzip an einem Kationenaustauscher durchgeführt.

Säulengröße: 26 x 150 mm

Material: Carboxymethylcellulose,
CM 52 Whatman (Preswollen)

Puffer: 8 M Harnstoff
0.02 M Natriumacetat
0.2 % Mercaptoäthanol
mit Essigsäure konz. auf pH 5.6 eingestellt

Die Säule wurde 12 h lang mit 32 ml/min äquilibriert.

Als Probe wurden 200 mg Globin in 20 ml nicht eingestelltem Puffer gelöst, mit 1 M Essigsäure auf pH 5.6 eingestellt und auf die Säule aufgetragen.

Durchflußgeschwindigkeit: 32 ml/h (8 ml/Fraktion)

Nach 60 min isokratischen Laufs (32 ml) wurden folgende lineare Gradienten angelegt:

Gradient I. 600 ml Startpuffer
600 ml Startpuffer + 0.1 M NaCl

Gradient II. 300 ml Startpuffer + 0.1 M NaCl
300 ml Startpuffer + 0.2 M NaCl

Anschließend wurde mit 0.3 M NaCl-Puffer eventuell noch auf

der Säule befindliches Protein eluiert. Die Fraktionen wurden bei 280 nm mit einem Spektralphotometer (UV 210 A, Shimadzu) vermessen. Nach Vereinigung der zusammengehörigen Fraktionen und Einengung des Volumens wurden diese über eine Gelfiltrationssäule (G-25 medium Sephadex, Pharmacia) mit 1 M Essigsäure entsalzt. Die entsalzten Kettenfraktionen wurden wiederum einrotiert und lyophilisiert. Die Identität und Reinheit wurden elektrophoretisch überprüft.

3.4.1.2. Kettentrennung KORMORAN

Die Kettentrennung über CM-Cellulose erfolgte in gleicher Weise wie in Absatz 3.4.1.1. beschrieben.

Puffer: 8 M Harnstoff

0.05 M Natriumacetat

0.2 % Thioglycerin

mit Essigsäure konz. eingestellt auf pH 5.6

Die Säule wurde 12 h mit 28 ml/h äquilibriert.

200 mg Globin wurden aufbereitet, wie in Absatz 3.4.1.1. beschrieben.

Durchflußgeschwindigkeit: 28 ml/h (7 ml/Fraktion)

Nach 75 min (35 ml isokratisch) wurde folgender NaCl-Gradient angelegt:

Gradient I. 400 ml Startpuffer

400 ml Startpuffer + 0.08 M NaCl

Gradient II. 500 ml Startpuffer + 0.08 M NaCl

500 ml Startpuffer + 0.2 M NaCl

Eventuell noch auf der Säule befindliches Protein wurde mit 0.3 M NaCl-Puffer eluiert.

Die Kettenfraktionen wurden wie in Absatz 3.4.1.1. beschrieben weiterbearbeitet und konserviert.

3.4.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.4.2.1. Kettentrennung PINGUIN

Die Trennung der Ketten mittels HPLC erfolgte über Umkehrphasen-Material (*reversed phase* (RP)).

Apparatur:

Pumpen	(112 SDM, Beckman)
Controller	(421 Controller, Beckman)
Photometer	(UV-Detector BT 3030, Biotronik)
Schreiber	(C R2AX, Shimadzu)

Säulengröße: 4.6 x 250 mm

Material: LiChrosorb RP 2, Partikelgröße 7 μ m,
Merck

Puffer (A): 0.1 M Ammoniumacetat
10 % Ameisensäure

Eluent (B): Acetonitril

Durchflußgeschwindigkeit: 1.0 ml/min

Als Probe wurden maximal 15 mg Globin im Puffer aufgenommen, abzentrifugiert und auf die Säule aufgetragen. Durch Anlegen

eines geeigneten Gradienten konnten die Ketten sauber isoliert werden. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur. Detektiert wurde bei 280 nm mittels Durchflußphotometer.

Gradient:

Äquilibrieren der Säule mit 35 % B
auf 60 % B in 50 min

Die HPLC-Fraktionen wurden im Stickstoffstrom trockengeblasen, in 0.1 M Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert. Die Identität und Reinheit der Ketten wurde elektrophoretisch überprüft.

3.4.2.2. Kettentrennung KORMORAN

Für die Kettentrennung über HPLC wurden zwei verschiedene *reversed phase* Trägermaterialien verwendet. (Apparatur siehe Absatz 3.4.2.1.)

I. Material: Nucleosil C 4, Partikelgröße 7µm,
Macherey-Nagel

Säulengröße: 4.6 x 250 mm

Puffer (A): 0.1 % Trifluoressigsäure

Eluent (B): Acetonitril

Durchflußgeschwindigkeit: 1.0 ml/min

2 mg Globin wurden in Puffer A aufgenommen, abzentrifugiert und auf die Säule aufgetragen. Es wurden mehrere Versuche bei Raumtemperatur mit verschiedenen Gradienten durchgeführt. Es konnte keine Trennung erreicht werden.

II. Material: LiChrosorb RP 2, Partikelgröße $7\mu\text{m}$, Merck

Säulengröße: 4.6 x 250 mm

Puffer (A): 0.1 M Ammoniumacetat
10 % Ameisensäure

Eluent (B): Acetonitril

Durchflußgeschwindigkeit: 1.0 ml/min

Es konnten maximal 3 mg Globin pro Lauf auf die Säule aufgebracht werden (Probe aufbereitet wie in Absatz I. beschrieben). Durch Anlegen eines geeigneten Gradienten konnte eine sehr gute Trennung erzielt werden.

Gradient:

Äquilibrieren der Säule mit 0 % B
auf 40 % B in 5 min
auf 50 % B in 20 min
auf 70 % B in 5 min

Die Trennung wurde bei 50°C durchgeführt.

Die HPLC-Fractionen wurden wie in Absatz 3.4.2.1. weiterverarbeitet.

3.5. Oxidation

Nach der Methode von Hirs (1956) wurden die Ketten (je 10 mg) mit Perameisensäure (Herstellung: Ameisensäure konz. + 30 % Wasserstoffperoxid im Verhältnis 10 : 1 bei $+4^{\circ}\text{C}$ für 1 h) für 5 - 10 min bei $+4^{\circ}\text{C}$ oxidiert.

3.6. Spaltung der Globinketten

3.6.1. Enzymatisch:

Alle enzymatischen Spaltungen wurden mit TPCK - Trypsin, Fa.Worthington, bei Raumtemperatur und verschiedenen pH - Werten in zwei Spaltphasen in Anlehnung an die von Guidotti et al.(1962) und Hirs (1967) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

10 - 15 mg oxidiertes Kettenmaterial wurde jeweils in 0.5 ml Aqua bidest. aufgenommen und mit verdünnter Ammoniaklösung auf pH 10.8 ± 0.2 eingestellt. Nach Zugabe von 2.5 % (der eingewogenen Proteinmenge) an Trypsin (in 100 μ l Aqua bidest. gelöst) wurde 90 min gespalten. Mit verdünnter Essigsäure wurde der pH - Wert des Ansatzes auf 9.0 ± 0.2 titriert, weitere 2.5 % Trypsin zugegeben und 90 min gespalten. Zum Abbruch der Spaltung wurde der pH - Wert mit Essigsäure konz. auf pH 3.8 abgesenkt beziehungsweise ein Trypsininhibitor zugesetzt.

Alle α - und β - Ketten von Pinguin und Kormoran wurden tryptisch gespalten.

Für den Abbruch einer Spaltung der β - Ketten des Pinguins wurde dem Ansatz Phenylmethansulfonylfluorid (5 mmol, gelöst in Isopropanol) als Trypsininhibitor zugesetzt.

Bei den β - Ketten von Pinguin und Kormoran und den α D-Ketten des Kormorans fiel beim Absenken des pH - Wertes etwas weißes Corepeptid aus, das abzentrifugiert, mit Aqua bidest. gewaschen und bei -20°C aufbewahrt wurde.

3.6.2. Chemisch:

Die Asp-Pro - Bindungsstelle von je 10 mg β -Ketten von Pinguin und Kormoran wurden nach der Methode von Jaurequi-Adell & Marti (1975) in 1 ml 6 M Guanidin/HCl und 70 %iger Ameisensäure bei 42°C hydrolytisch gespalten. Die Spaltdauer betrug bei den β -Ketten des Pinguins zunächst 72 h, wobei zahlreiche Nebenspaltungen auftraten. Nach Verkürzen der Spaltzeit auf 50 h konnte ein gutes Ergebnis für die β -Ketten von Pinguin und auch Kormoran erzielt werden.

3.7. Isolierung der Spaltprodukte

3.7.1. Gelfiltration

3.7.1.1. von tryptischen Peptiden:

Zur Vortrennung der tryptischen Peptide der β -Ketten des Pinguins wurde eine Gelfiltration über eine Sephadex G-25 fine - Säule durchgeführt.

Säule: 2.6 x 160 cm

Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogenkarbonat

mit Ammoniak konz. auf pH 9.0 eingestellt

Durchflußgeschwindigkeit: 16 ml/h (4 ml/Frakt.)

Die Vortrennungsgipfel wurden bei 230 nm mit einem Spektralphotometer (UV 210 A, Shimadzu) vermessen, die zusammengehörigen Fraktionen vereinigt, mittels Rotationsverdampfer eingeengt und lyophilisiert.

3.7.1.2. von hydrolytischen Spaltprodukten:

Die Trennung der hydrolytischen Spaltprodukte der beiden β -Ketten erfolgte über eine Sephadex G-50 fine - Säule.

Säule: 2.6 x 170 cm
 Eluent: 8 M Harnstoff
 10 % Ameisensäure

Durchflußgeschwindigkeit: 20 ml/h (5 ml/Frakt.)

Die Trennungen wurden mittels Durchflußphotometer (ISCO Model UA - 5) bei 280 nm vermessen. Die vereinigten Gipselfraktionen wurden über eine Sephadex G-25 medium - Säule (2.6 x 100 cm) mit 1.0 M Essigsäure entsalzt (Durchflußgeschwindigkeit: 160 ml/h ; 8 ml/Frakt.), einrotiert und lyophilisiert.

3.7.2. Blockierung des N -Terminus

Nach der hydrolytischen Spaltung der Asp-Pro - Bindung der β -Ketten des Pinguins wurden die N-Termini im ungetrennten Spaltansatz in Anlehnung an die Methode nach Brauer et al.(1984) mit einem 1000fachen Überschuß an Orthophthal-dialdehyd (OPA)(Ansatz: 50 mg OPA in 1 ml Äthanol od. Methanol + 0.1 ml Mercaptoäthanol) blockiert. OPA blockiert alle Aminogruppen, aber nicht die Iminogruppe des Prolins. 3.6 nmol des Pro - Peptids wurden im Gasphasensequenzier vier Schritte ansequenziert.

3.7.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC - Methode nach Kratzin et al.(1980) wurde zur Trennung von tryptischen Peptidgemischen (mit oder ohne Vortrennung), der Corepeptide und hydrolytischer Spaltansätze verwendet.

Apparatur: s. Absatz 3.4.2.

3.7.2.1. Trennung von Peptidgemischen, Corepeptide

Säule: 4.6 x 250 mm

Material: LiChrosorb RP 2, Partikelgröße 7 μ m,
 Merck, Darmstadt

Vydac TP-RP 18, Partikelgr. 10 μm ,
Macherey-Nagel, Düren

Puffer (A): 0.05 M Ammoniumacetat (LiChrosorb)

0.1 % Trifluoressigsäure (Vydac)

Eluent (B): Acetonitril

Temperatur: Raumtemperatur oder 50°C

Durchflußgeschwindigkeit: 1.0 ml/min

Gradient: auf 40 % B in 40 min

auf 60 % B in 10 min

(wurde je nach Problemstellung variiert)

3.7.2.2. Trennung hydrolytischer Spaltprodukte

Säule: 4.6 x 25 mm

Material: LiChrosorb RP 2

Nucleosil C 4, Partikelgr. 10 μm ,

Macherey - Nagel (Kationenaustauscher)

Puffer (A): 15 % Ameisensäure

0.1 M Ammoniumacetat (LiChrosorb)

0.2 % Trifluoressigsäure (Nucleosil)

Eluent (B): Acetonitril

Temperatur: Raumtemperatur

Durchflußgeschwindigkeit: 0.75 ml/min

Gradient: mit 35 % B äquilibriert

35 % B isokratisch für 4 min

auf 70 % B in 0.1 min
(für LiChrosorbmaterial)

mit 30 % B äquilibriert

auf 60 % B in 60 min
(für Nucleosilmaterial)

Die aufgefangenen Fraktionen wurden im Stickstoffstrom trockengeblasen, in 0.1 M Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

3.8. Analysen

Zur Bestimmung der Bruttoformel von Globinketten und Peptiden wurden, wie bei Spackman et al. (1958) beschrieben, jeweils 2 - 4 nmol in 5.7 M Salzsäure für 20 h beziehungsweise 200 h bei 110°C hydrolysiert. Durch vorherige Oxidation des Materials wurden Methionine und Cysteine bestimmt, durch Zusatz von 6 % Thioglycolsäure wurde der Tryptophangehalt der Ketten ermittelt. Die Salzsäure wurde in einer heizbaren Vakuumzentrifuge entfernt, das hydrolysierte Material in 100 µl Citratpuffer pH 2.2 aufgenommen und im automatischen Aminosäureanalysator (Model LC 5000, Biotronik) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem bei steigender Temperatur getrennt und detektiert.

3.9. Sequenzierung

3.9.1. Flüssigphasen - Sequenator

Die Sequenzierung von Globinketten und längeren Peptiden erfolgte nach Edman - Begg (1967) mittels der Filmtechnik im automatischen Aminosäuresequenator (Beckman 890 B, 890 C, 890 C II). Für die Ketten wurden 125 nmol, für die Peptide je nach Länge 10 - 60 nmol eingesetzt. Es wurden zwei Abbauprogramme verwendet:

I. Quadrolprogramm: (Kupplungspuffer 0.25 M Quadrol, nach Braunitzer et al. 1978)

für Globinketten und mit Reagenz IV (Braunitzer et al. 1971) modifizierte Lysinpeptide.

II. Propinprogramm: (Kupplungspuffer 1.25 M Diethylamino-propin, pH 9.0, nach Braunitzer et al. 1970)

für Argininpeptide, C-terminale hydrolytische Peptide, kleine (bis 4 Aminosäuren) hydrophile sowie große hydrophobe, mit Reagenz I (Pfleischinger et al. 1980) modifizierte Lysinpeptide.

Die Konversion erfolgte automatisch im Autokonverter (Sequemat P 6, Fa. Kontron Technik GmbH) mit 3 M Trifluoressigsäure bei 60°C oder manuell mit 3 M Trifluoressigsäure, 14 min bei 80°C.

3.9.2. Gasphasen - Sequenator

Die Sequenzierung der meisten Peptide erfolgte im Gasphasensequenator. Als Gerät stand ein in diesem Institut in Zusammenarbeit mit G.Begg (Begg et al. 1986) gebauter Sequenator zur Verfügung, der Abbau erfolgte in Anlehnung an die Methode von Hunkapiller et al. (1983) (Grundlage Edman - Abbau). Pro Peptid wurden 3 nmol eingesetzt.

Reagentien und Lösungsmittel

R 1 = 10 % Phenylisothiocyanat

R 2 = 2 M Tertiäre Base in Wasser

(Trimethylamin, Dimethylallylamin
(Braunitzer et al. 1987)

R 3 = Trifluoressigsäure (wasserfrei)

S 1 = Benzol/Hexan (1/1)

S 2 = Essigsäureethylester

S 3 = Butylchlorid

Als Trägergas fungierte Argon.

3.9.3. Identifikation der PTH - Aminosäuren

1 - 3 nmol der PTH - Aminosäuren wurden jeweils über HPLC identifiziert. Es wurden zwei verschiedene Elutionsverfahren angewandt.

System A: Stufengradientenelution nach

Zimmerman et al.(1977)

mit einem Gerät der

Fa. Hewlett Packard (1084 B Liquid Chromatograph)

Säule: Hypersil RP 18 ODS, Shandon

4.6 x 250 mm

Flußrate: 1.2 ml/min

Puffer (A): 10 mM Ammoniumacetat pH 4.8

Eluent (B): Acetonitril

Stufengradient: Nach 0 min 10 % B

" 1 min 20 % B

" 5 min 45 % B

" 14 min 70 % B

" 19 min 10 % B

Temperatur: 60°C

Detektion: 265 und 320 nm

Ser und Thr ergeben negative Gipfel

System B: Isokratische Elution (nach Lottspeich 1980)

Säule: wie oben

Puffer: 0.685 ml 0.01 M Natriumacetat pH 5.2

0.315 ml Acetonitril, 5 ml Dichloräthan

Flußrate: 1.7 ml

Temperatur: 60°C

Detektion: 265 nm , für Thr und Ser 320 nm

4. Ergebnisse

Hämoglobine von Kormoran und Pinguin

4.1. Komponenten und Ketten

4.1.1. Komponenten

Zur Ermittlung der Anzahl der Komponenten wurde natives Gesamthämolytats elektrophoretisch (Disk-Elektrophorese s.Kap. 3.2.1.1.) und -sehr viel genauer- mittels *Schneller Protein Flüssigkeitschromatographie* (FPLC s.Kap.3.3) getrennt.

4.1.1.1. Pinguin

Es ergab sich eine einheitliche Bande (Disk) (s.Abb.3) beziehungsweise Gipfelfraktion (FPLC) (s.Abb.1); somit zeigt das Hämoglobin dieser Pinguinart nur eine Komponente, während die Mehrzahl der bis jetzt bekannten Vögel zwei Komponenten aufweist.

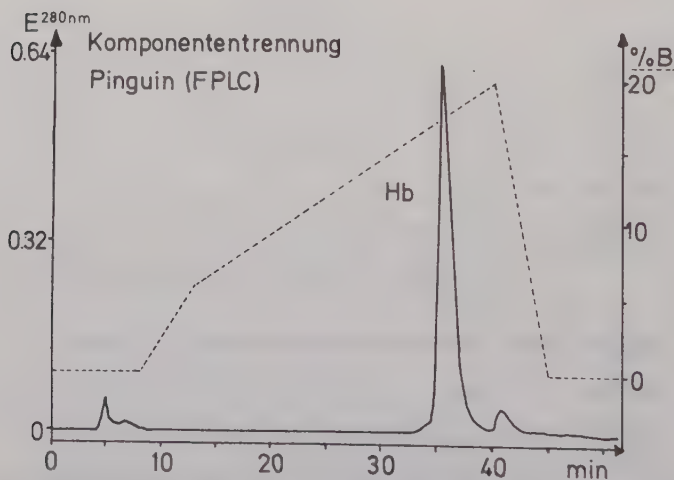


Abb.1 Säule: Kationenaustauscher TSK SP 5 PW, 8x75 mm, LKB
 Puffer A: 0.01 M NaH_2PO_4 pH 4.91
 0.01 M Na_2HPO_4 pH 9.64
 durch Mischung auf pH 7.0
 Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl
 Durchfluß: 0.5 ml/min
 Probe: 125 μg Protein (Hämolytats)
 Gradient: 8 min isokratisch bei 0 %B
 in 5 min auf 6 %B
 in 27 min auf 20 %B
 Detektion: UV, 280 nm

4.1.1.2. Kormoran

Es ergaben sich zwei Banden unterschiedlicher Intensität (Disk) (s.Abb.4) beziehungsweise zwei Gipfelfraktionen (FPLC) (s.Abb.2). Somit zeigt diese Kormorangattung zwei Komponenten, wobei die Hauptkomponente als Hb A, die Nebenkomponekte als Hb D bezeichnet wird.

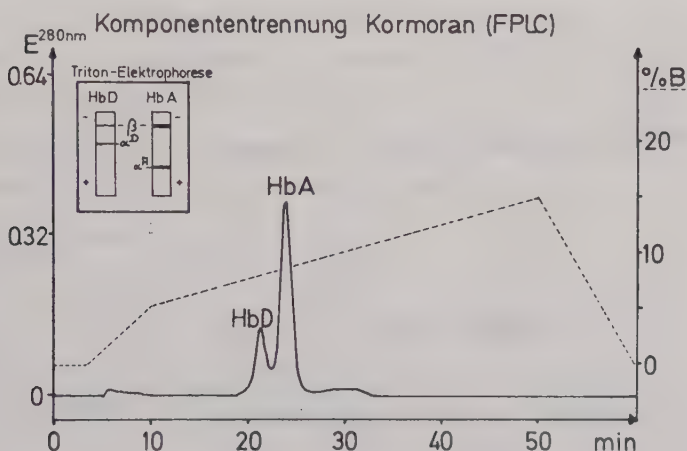


Abb. 2 Säule, Puffer A+B, Durchfluß s. Abb. 1
 Probe: 125 μ g Protein (Hämolyat)
 Gradient: 5 min isokratisch bei 0 %B
 in 5 min auf 10 %B
 in 40 min auf 15 %B

Detektion: UV, 280 nm

4.1.2. Ketten

Zur Ermittlung der Anzahl der Ketten wurde Gesamthämolyat wie auch die Gipfelfraktionen der FPLC - Läufe elektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen (Triton-Elektrophorese) analysiert.

4.1.2.1. Pinguin

Es zeigten sich zwei Kettenbanden (s. Abb. 3), wobei die α -Kettenbande schneller im elektrischen Feld wandert als die β -Kettenbande. Die α -Ketten zeigten eine schwache Nebenbande, die sich nach der Sequenzanalyse aber als einheitlich mit der Hauptbande erwies.

Abb. 3

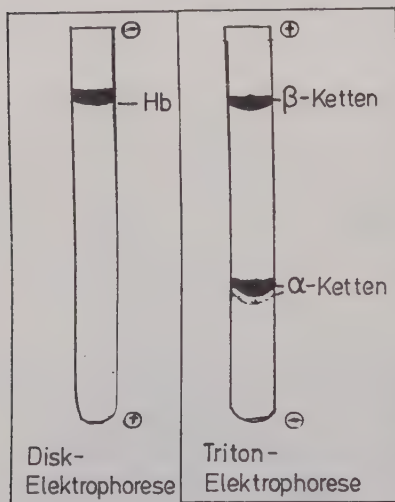
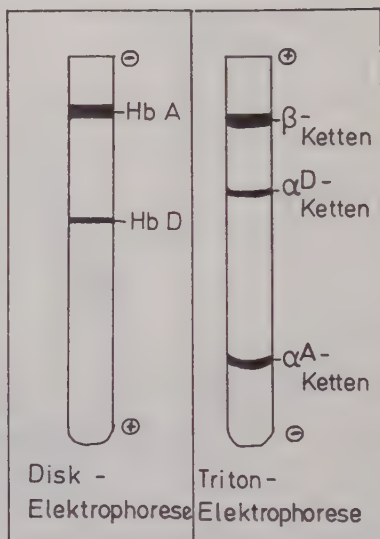


Abb. 4



4.1.2.2. Kormoran

Es ergaben sich zwei α -Kettenbanden und eine β -Kettenbande (s. Abb. 2, 4). Die α^A -Ketten mit der größten Mobilität im elektrischen Feld sind Bestandteil der Hauptkomponente Hb A, die α^D -Ketten mit geringerer Mobilität sind Bestandteil der Nebekomponente Hb D. Die β -Ketten besaßen die geringste Mobilität.

4.2. Kettentrennungen

Die Kettentrennungen wurden mit 200 mg Globin an CM-Cellulose (s.Kap. 3.4.1.1.) durchgeführt. Die Reinheit und Identität der Ketten wurden elektrophoretisch (Triton) festgestellt.

Mittels HPLC-Methode (s.Kap. 3.4.2.1.) wurden mehrere Kettentrennungen an LiChrosorb RP 2 Material (Pinguin, Kormoran) und Nucleosil C 4 Material (Kormoran) durchgeführt. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines Acetonitrilgradienten, wobei die β -Ketten wegen ihrer größeren Hydrophobizität eine längerer Retentionszeit aufwiesen als die α -Ketten.

4.2.1. Pinguin

Die α - und β -Ketten ließen sich rein über CM-Cellulose isolieren (s.Abb.5).

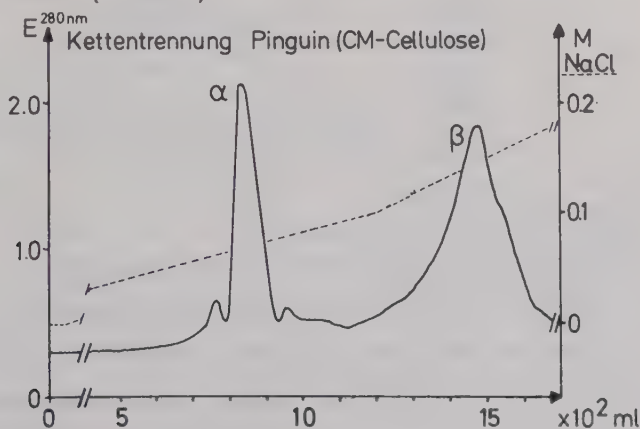


Abb.5

Säule: 2.6 x 15 cm

Puffer: 8 M Harnstoff

0.02 M Natriumacetat

0.2 % Mercaptoäthanol

mit Essigsäure (konz.) auf pH 5.6

Durchfluß: 32 ml/h (8 ml/Frakt.)

Probe: 200 mg Globin in 20 ml Puffer

Gradient: I. 600 ml Startpuffer

600 ml " + 0.1 M NaCl

II. 300 ml " + 0.1 M NaCl

300 ml " + 0.2 M NaCl

Detektion: UV, 280 nm

Die Trennungen mittels HPLC konnten mit maximal 15 mg Globin (gelöst in Puffer A) durchgeführt werden. Die Ketten erwiesen sich elektrophoretisch als rein (s.Abb.6)

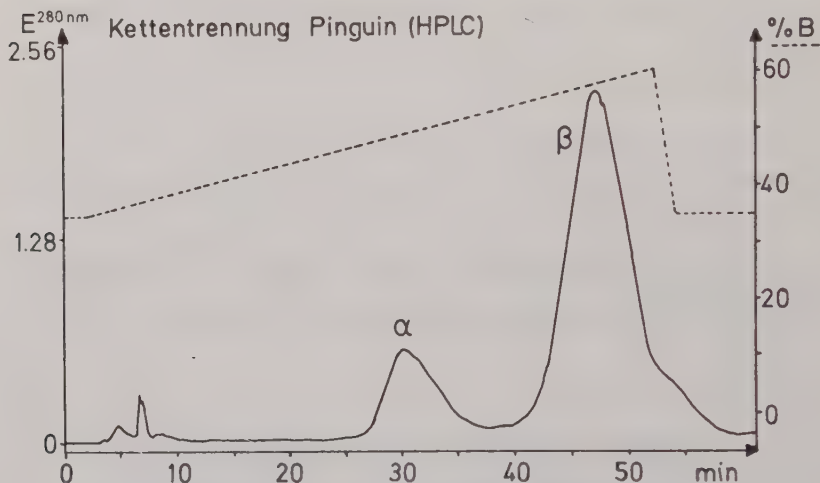


Abb.6 Säule: 4.6 x 250 mm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.1 M Ammoniumacetat/ 10 % Ameisensäure
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / Raumtemperatur
 Probe: max. 15 mg Globin in Puffer A gelöst
 Gradient: Säule mit 35 %B äquilibrieren
 nach 3 min auf 60 %B in 50 min
 Detektion: UV, 280 nm

4.2.2. Kormoran

Das Ergebnis der Trennung über CM-Cellulose war nicht befriedigend. Die α^D -Ketten erwiesen sich zwar elektrophoretisch als rein, die α^A - und β -Ketten waren aber mit jeweils etwa 15 - 20 % der anderen verunreinigt (s.Abb.7).

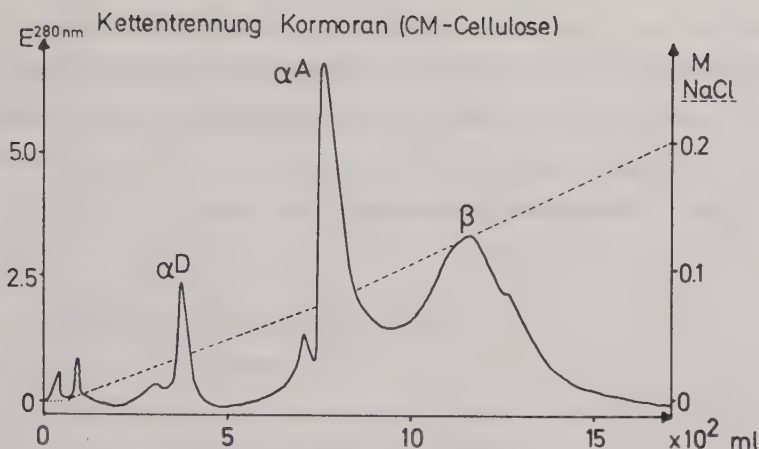


Abb. 7 Säule: 2.6 x 15 cm
 Puffer: 8 M Harnstoff
 0.05 M Natriumacetat
 0.2 % Thioglycerin
 mit Essigsäure (konz.) auf pH 5.6 eingest.
 Durchfluß: 28 ml/h (7 ml/Frakt.)
 Probe: 200 mg Globin in 20 ml Puffer
 Gradient: I. 400 ml Startpuffer
 400 ml " + 0.08 M NaCl
 II. 500 ml " + 0.08 M NaCl
 500 ml " + 0.2 M NaCl
 Detektion: UV, 280 nm

Die Trennung der Ketten mittels HPLC über Nucleosil C 4 Material (Säule: 4.6 x 250 mm) mit 0.1 % TFA (Puffer A) und Acetonitril (Eluent B) bei Raumtemperatur gelang nicht. Alle Ketten konnten trotz Änderung des Gradientenverlaufs nur zusammen eluiert werden (ohne Abb.)

Eine Trennung der Ketten mittels HPLC über LiChrosorb RP 2 Material bei 50°C erwies sich dagegen als gut durchführbar. Alle Ketten konnten rein (elektrophoretische Überprüfung) isoliert werden (s.Abb.8).

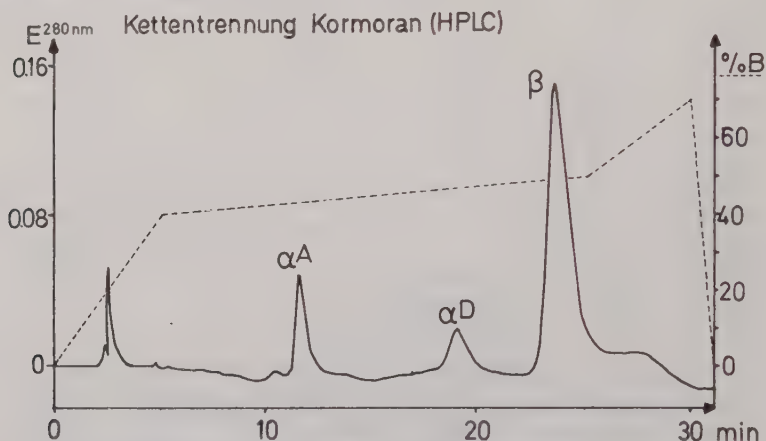


Abb.8 Säule: 4.6 x 250 mm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.1 M Ammoniumacetat/ 10 % Ameisensäure
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / 50°C
 Probe: max. 3 mg Globin in Puffer A gelöst
 Gradient: Äquilibrieren der Säule mit 0 %B
 in 5 min auf 40 %B
 in 20 min auf 50 %B
 in 5 min auf 70 %B
 Detektion: UV, 280 nm

4.3. Analysen

Für jede Kette wurden je 2 nmol oxidiertes (s.Kap. 3.5.) Material für eine 20 h- und eine 200 h- Analyse zur Ermittlung der Bruttoformel eingesetzt (s.Kap.4.8.Tab.1,2, 4,5,6). Die 200 h- Analyse diente dazu, schwer spaltbare Bindungen zwischen hydrophoben Aminosäuren zu öffnen und so eine genaue Aminosäurezusammensetzung zu erhalten.

4.4. Sequenzierung

Die Sequenz der Aminosäuren der ersten 42 Schritte der Ketten wurde durch Sequenzieren der nativen Ketten im Flüssigphasensequenzator ermittelt (s.Kap. 3.9.+ 4.8.Tab.3,7, 8). Die Bruttoformeln der tryptischen Peptide 1 - 4 (Pos.1-40) wurden mittels Analysen erfaßt.

4.5. Tryptische Spaltung und Isolierung

der Peptide der α -Ketten

Jeweils 15 mg oxidiertes (s.Kap. 3.5.) α -Kettenmaterial wurde mit 5 % Trypsin enzymatisch gespalten (s.Kap. 3.6.). Die Oxidation des Materials erfolgte, um die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen zu lösen und so die Löslichkeit der Ketten zu erhöhen, damit die Spaltstellen für das Trypsin besser zugänglich werden. Außerdem werden an den Seitenketten von Methionin und Cystein einheitliche Oxidationsstufen hergestellt (Cysteinsäure, Methioninsulfon). Dabei entstehen aber Zerfalls- oder Umlagerungsprodukte von Tyrosin, Tryptophan und Histidin, wodurch für Peptide mit diesen Aminosäuren in der Regel mehrere Gipfel in einer Trennung auftreten.

Bei Abbruch der Spaltung durch Titration des pH- Wertes auf 3.8 fiel bei den α -Ketten des Pinguins und den α^A -Ketten des Kormorans kein Corepeptid aus, bei den α^D -Ketten des Komorans konnte etwas Corepeptid abzentrifugiert werden. Der gesamte lösliche Spaltansatz wurde mittels HPLC über LiChrosorb RP 2 Material bei 50°C (verbessert die Trennschärfe) getrennt. Für jeden Lauf konnten maximal 250 nmol auf die Säule aufgetragen werden.

Die isolierten Peptide wurden mittels Dünnschichtelektrophorese (s.Kap.3.2.2.) auf ihre Reinheit überprüft und gegebenenfalls über Vydac RP 18 Material nachgereinigt.

Vydac RP 18 Material besitzt eine höhere Selektivität für strukturähnliche Peptide (vor allem kleinere Peptide) infolge der längeren hydrophoben Seitenketten.

Die Identität der Peptide wurde durch Analysen (s.Kap.3.5.+ 4.8.) und die Sequenzierung im Gasphasen- und Flüssigphasensequenzator (s.Kap.3.9.+ 4.8.) geklärt und nach der Homologie zu den Globinketten des Menschen zugeordnet.

4.5.1. Pinguin α - Ketten

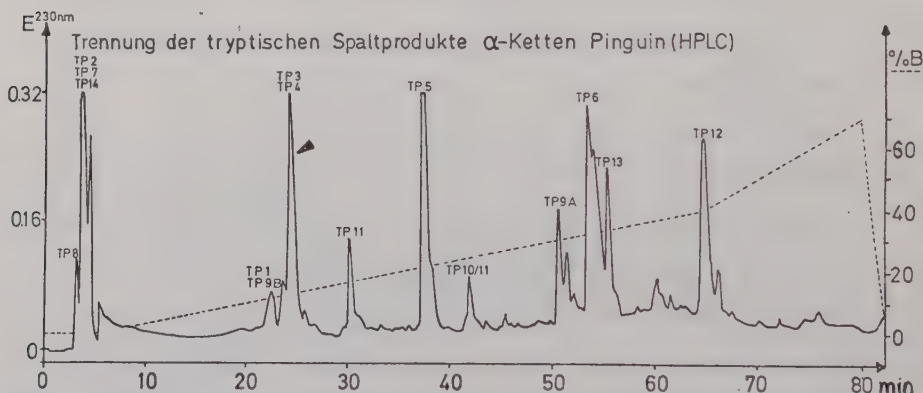


Abb. 9 Säule: 4.6 x 250 mm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.05 M Ammoniumacetat
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / 50°C
 Probe: trypt. Spaltansatz, max. 250 nmol
 Gradient: 5 min isokratisch bei 0 %B
 in 60 min auf 40 %B
 in 15 min auf 70 %B
 Detektion: UV, 230 nm

Alle mehrfach besetzten Gipfel wurden in gleicher Weise wie in Abbildung 10 aufgeführt rechromatographiert. Die tryptischen Peptide 1,2,3,4,9B und 14 konnten so rein isoliert werden (Analysen und Sequenz s.Kap.4.8.Tab.1 + 3).

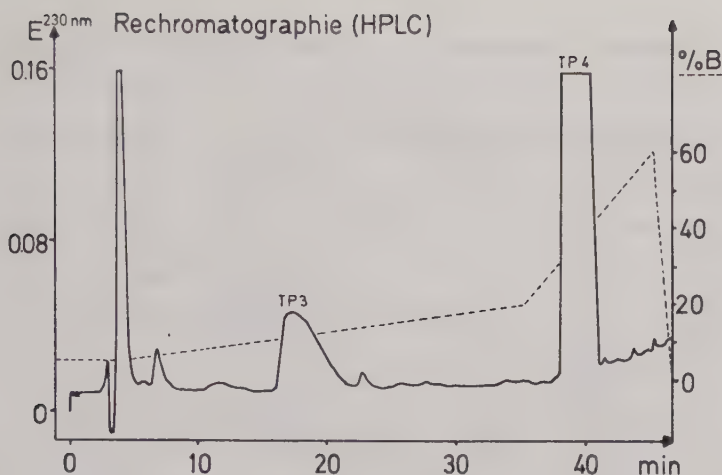


Abb.10 Säule: 4.6 x 250 mm, Vydac RP 18
 Puffer A: 0.1 % TFA
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / Raumtemperatur
 Probe: 4-Gipfelfraktion (Pfeil)(α -Ketten)
 Gradient: 5 min isokratisch bei 0 %B
 in 30 min auf 20 %B
 in 10 min auf 60 %B
 Detektion: UV, 230 nm

4.5.2. Kormoran α^A -Ketten

Die Trennung der tryptischen Spaltprodukte erfolgte in gleicher Weise wie bei den α -Ketten des Pinguins (s. Abb. 9). Das TP 13 zeigte sich beim Kormoran zweigeteilt als TP 13A und 13B, wobei 13A zusammen mit TP 9B eluiert wurde (Isolierung über Vydac RP 18 Material unter den gleichen Bedingungen wie in Abbildung 10 beschrieben). TP 13B konnte aus dem Startgipfel zusammen mit TP 1, 2, 7, 14 und 10 über Vydac RP 18 Material (s. Abb. 10 Bedingungen) isoliert werden. Ein Teil des TP 13A war nicht vom TP 12 abgespalten. (Analysen und Sequenz s. Kap. 4.8. Tab. 4, 7)

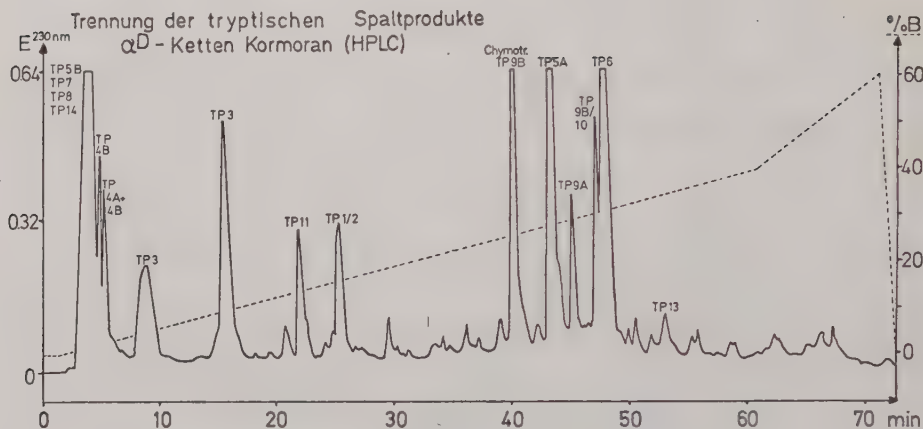
4.5.3. Kormoran α^D -Ketten

Abb.11 Säule: 4.6 x 250 mm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.05 M Ammoniumacetat
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / 50°C
 Probe: trypt.Spaltansatz, max. 250 nmol
 Gradient: 1 min isokratisch bei 0 %B
 in 60 min auf 40 %B
 in 10 min auf 60 %B
 Detektion: UV, 230 nm

Alle mehrfach besetzten Gipfel wurden wie oben in Kap. 4.5.1. beschrieben (Abb.10) rechromatographiert. Die tryptischen Peptide 4A,4B,5B,7,8 und 14 konnten so rein isoliert werden. (Analysen und Sequenz s.Kap.4.8.Tab.6,8).

Das Corepeptid (in Ameisensäure unlöslich) wurde in 0.05 M Ammoniumacetatpuffer, der mit konzentriertem Ammoniak auf den pH- Wert 9.7 eingestellt wurde, gelöst und mittels HPLC über LiChrosorb RP 2 Material mit diesem Puffer nachgereinigt. Es konnte das beim Kormoran nicht zweigeteilte TP 12 isoliert werden (s.Abb.12).

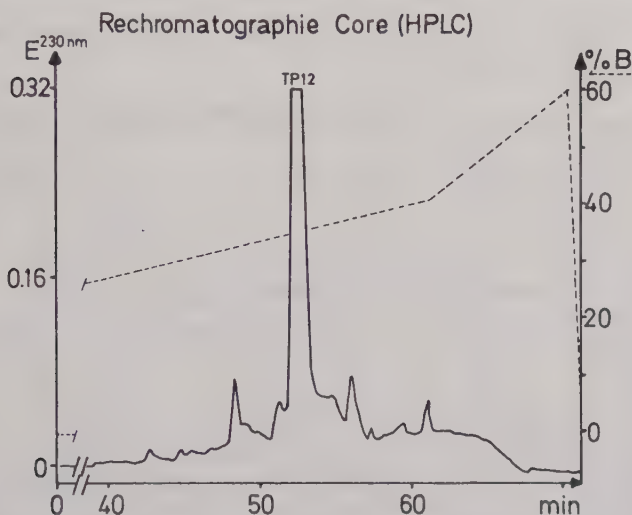


Abb.12 Säule: 4.6 x 250 nm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.05 M Ammoniumacetat
 mit Ammoniak (konz.) auf pH 9.7 eingest.
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / Raumtemperatur
 Probe: Corepeptid gelöst in Puffer A (α^D)
 Gradient, Detektion s.Abb.11

4.6. Tryptische Spaltung und Isolierung

der Peptide der β -Ketten

Jeweils 15 mg oxidiertes (s.Kap.3.5.) β -Kettenmaterial wurde mit 5 % Trypsin enzymatisch gespalten (s.Kap.3.6.1.). Die gefundenen Peptide wurden mittels Analysen (s.Kap. 3.8.+ 4.8.) und Sequenzermittlung im Flüssig- oder im Gasphasensequenzator (s.Kap.3.9.+ 4.8.) identifiziert.

4.6.1. Pinguin β -Ketten

Die Spaltung wurde durch Zusatz des Trypsininhibitors Phenylmethansulfonylfluorid ($C_7H_7FO_2S$; 5 mmol) beendet. Durch die Verwendung eines Inhibitors für das Enzym wurde erreicht, daß das in der Regel durch pH- Wertsenkung bei den β -Ketten der Vögel ausfallende Corepeptid (beinhaltet das TP 12) in Lösung blieb, da der pH- Wert des Spaltansatzes auf 9.0 gehalten wurde.

Der Spaltansatz wurde über eine Sephadex G-25 Säule (s.Kap. 3.7.1.1.) vorfraktioniert (s.Abb.13).

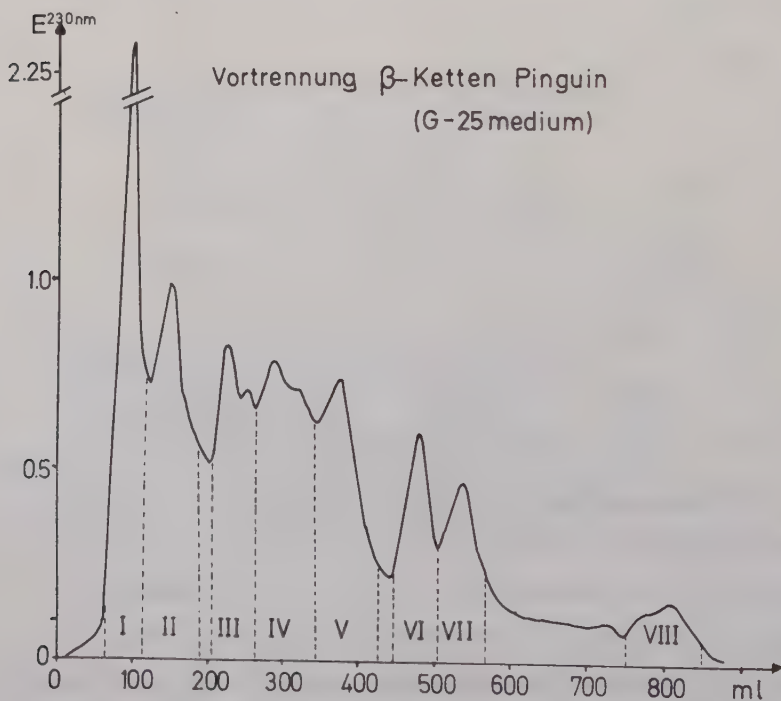


Abb.13 Säule: 2.6 x 160 cm
 Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogenkarbonat,
 mit Ammoniak (konz.) auf pH 9.0 eingest.
 Durchfluß: 16 ml/h (4 ml/Frakt.)
 Probe: trypt.Spaltansatz (10 mg Protein)
 Detektion: UV, 230 nm

Die Peptidgemische der Gipfelfraktionen wurden nach Überprüfung mittels Dünnschichtelektrophorese (ohne Abb.) nach der HPLC-Methode über LiChrosorb RP 2 beziehungsweise Vydac RP 18 Material getrennt (s. Abb. 14-18). Fraktion I enthielt ungespaltene Ketten, Fraktion VII zu geringe Mengen und Fraktion VIII eine Verunreinigung, die hauptsächlich aus Glycin bestand.

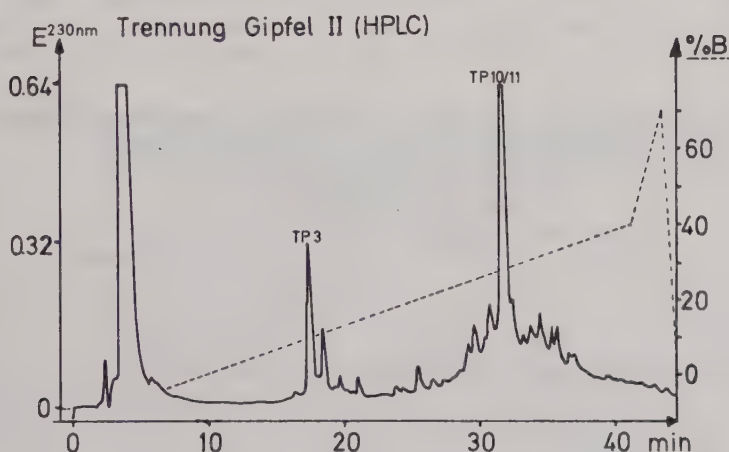


Abb. 14 Säule: 4.6 x 250 mm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.05 M Ammoniumacetat
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / 50°C
 Probe: Gipfelfraktion II der Vortrennung
 Gradient: 3 min isokratisch bei 0 %B
 in 38 min auf 38 %B
 in 2 min auf 70 %B
 Detektion: UV, 230 nm

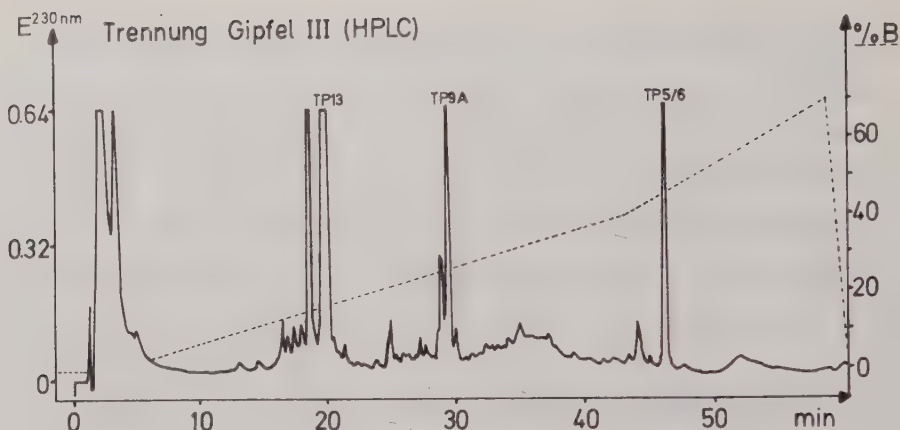


Abb. 15 Säule, Puffer, Eluent, Durchfluß, Temperatur s. Abb. 14
 Probe: Gipfel fraktion III der Vortrennung
 Gradient: 3 min isokratisch bei 0 %B
 in 40 min auf 40 %B
 in 15 min auf 70 %B
 Detektion s. Abb. 14

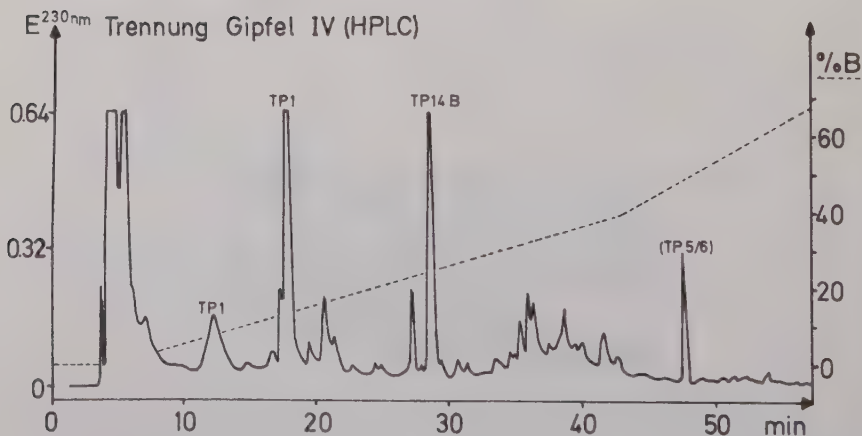


Abb. 16 Säule, Puffer, Eluent, Durchfluß, Temperatur s. Abb. 14
 Probe: Gipfel fraktion IV der Vortrennung
 Gradient, Detektion s. Abb. 15

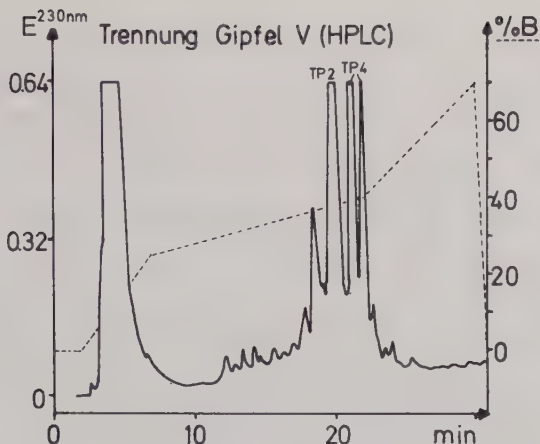


Abb.17 Säule, Puffer, Eluent, Durchfluß, Temperatur s. Abb.14
 Probe: Gipfelfraktion V der Vortrennung
 Gradient: 2 min isokratisch bei 0 %B
 in 5 min auf 25 %B
 in 15 min auf 40 %B
 in 8 min auf 70 %B
 Detektion s. Abb.14

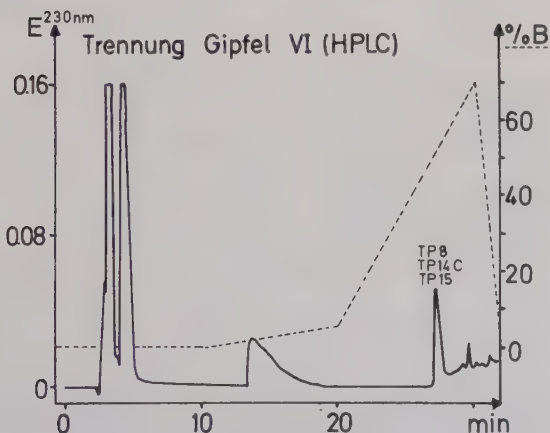


Abb.18 Säule: 4.6 x 250 mm, Vydac RP 18
 Puffer A: 0.1 % TFA
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / Raumtemperatur
 Probe: Gipfelfraktion VI der Vortrennung
 Gradient: 10 min isokratisch bei 0 %B
 in 10 min auf 5 %B
 in 10 min auf 70 %B
 Detektion s. Abb.14

Tp 7, 9B, 12 und 14A waren nicht auffindbar.

Für die Gewinnung dieser Peptide wurde eine weitere tryptische Spaltung mit 10 mg oxidiertem β -Kettenmaterial durchgeführt. Beim Absenken des pH- Wertes fiel etwas Corepeptid aus. Nach der Trennung des gesamten löslichen Spaltansatzes mittels HPLC (ohne Abb.) konnten aus dem Startgipfel nach Rechromatographie über Vydac RP 18 Material die fehlenden Peptide 7, 9B und 14A isoliert werden (ohne Abb.). Tp 12 war im löslichen Teil nicht zu finden.

(Analysen und Sequenz s.Kap.4.8.Tab.2,3).

Eine Trennung des Corepeptides (löste sich zum Teil in 0.3 %iger TFA) wurde mittels HPLC über LiChrosorb RP 2 Material und 0.1 %iger TFA als Puffer (A), Acetonitril als Eluent (B) versucht. Es konnten keine Peptide eluiert werden (ohne Abb.). Der in TFA unlösliche Teil wurde in konzentrierter Ameisensäure gelöst und im selben System weiterverarbeitet. Auch hier konnten keine Peptide eluiert werden (ohne Abb.). Die Analyse und das Ansequenzieren beider Ansätze ergab, daß in unterschiedlichen Konzentrationen TP 12, 4, 10 und 5/6 enthalten waren.

4.6.2. Kormoran β - Ketten

Bei Abbruch der Spaltung fiel etwas Corepeptid aus. Der lösliche Teil wurde vollständig über LiChrosorb RP 2 Material mittels HPLC getrennt (s.Abb.20). Es konnten alle Peptide außer dem TP 12 isoliert werden. Die mehrfach besetzten Gipfel wurden über Vydac RP 18 rechromatographiert (s.Abb.21,22). (Analysen und Sequenz s.Kap.4.8.Tab.5,7).

Das Corepeptid wurde in 0.1 %iger TFA gelöst und mittels HPLC über LiChrosorb RP 2 Material getrennt (s.Abb.23). Es konnte TP 5/6 isoliert werden, welches auch im löslichen Teil vorhanden war. Ein zweiter Gipfel enthielt ein Peptidgemisch, unter anderem auch TP 12, welches aber nicht rein isoliert werden konnte.

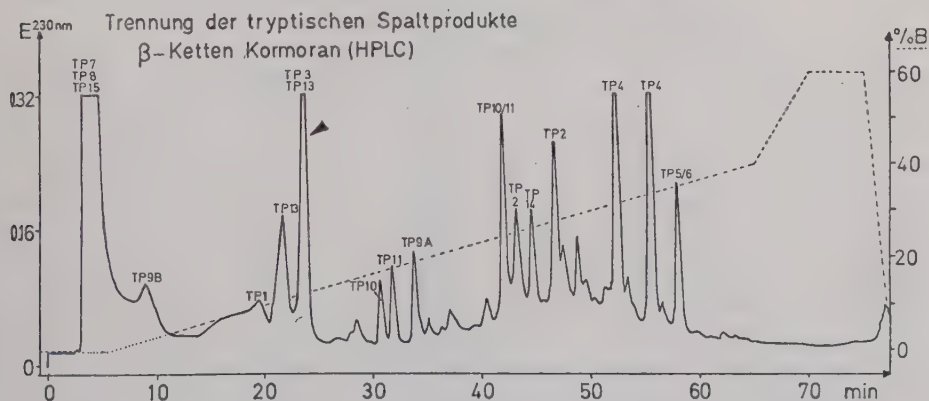


Abb.20 Säule: 4.6 x 250 mm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.05 M Ammoniumacetat
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / 50°C
 Probe: trypt.Spaltansatz, max. 250 nmol
 Gradient: 5 min isokratisch bei 0 %B
 in 60 min auf 40 %B
 in 5 min auf 60 %B
 Detektion: UV, 230 nm

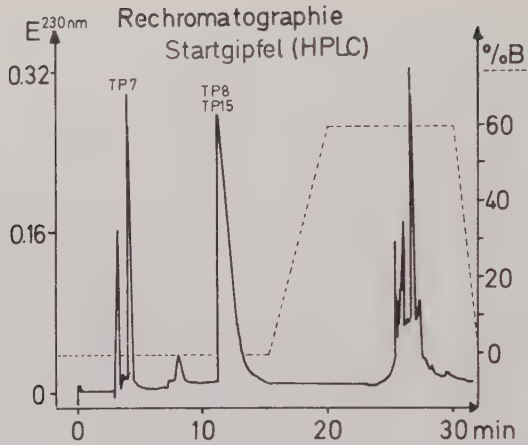


Abb.21 Säule: 4.6 x 250 mm, Vydac RP 18
 Puffer A: 0.1 % TFA
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / 50°C
 Probe: Startgipfelfraktion (β -Ketten)
 Gradient: 15 min isokratisch bei 0 %B
 in 5 min auf 60 %B
 Detektion: UV, 230 nm

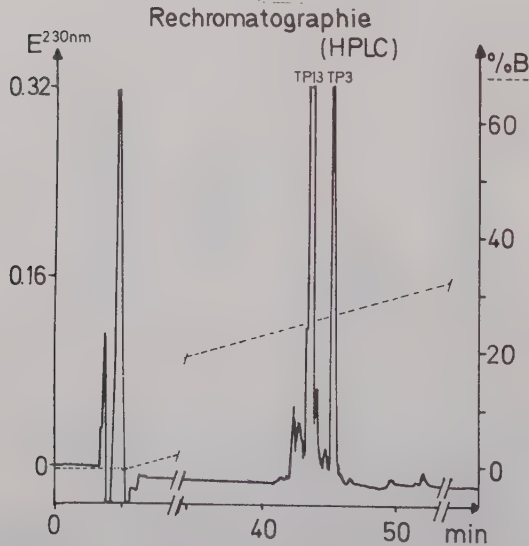


Abb.22 Säule, Puffer, Eluent,
 Durchfluß, Temperatur s. Abb.21
 Probe: 5. Gipfelfraktion (Pfeil) (β -Ketten)
 Gradient: 5 min isokratisch bei 0 %B
 in 60 min auf 40 %B
 in 5 min auf 60 %B
 Detektion: UV, 230 nm

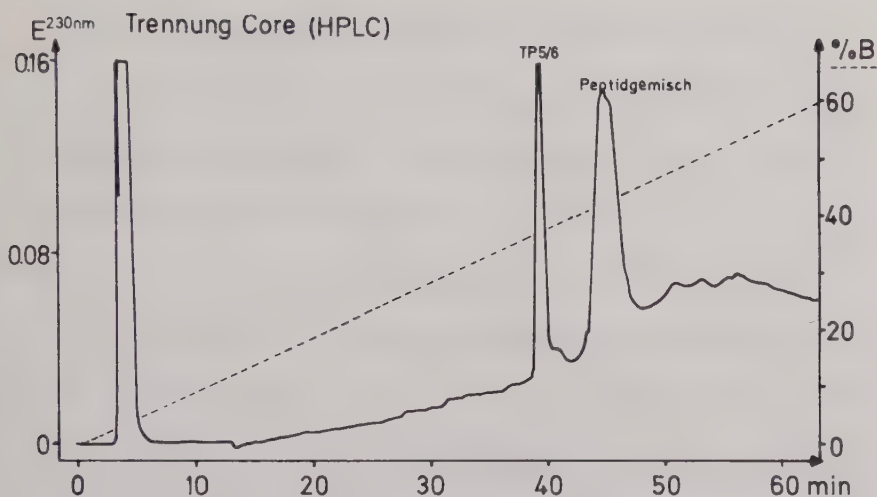


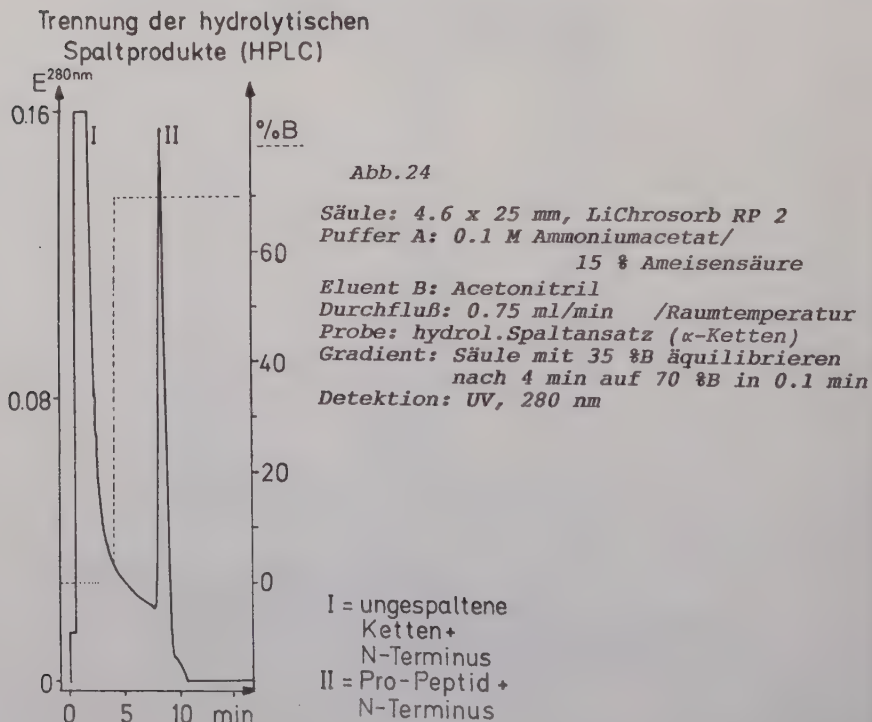
Abb.23 Säule: 4.6 x 250 mm, LiChrosorb RP 2
 Puffer A: 0.1 % TFA
 Eluent B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min / Raumtemperatur
 Probe: Corepeptid gelöst in Puffer A (β)
 Gradient: in 60 min auf 60 %B
 Detektion: UV, 230 nm

4.7. Chemische Spaltung der Asp-Pro - Bindung der β -Ketten
 Zur Ermittlung des TP 12 (Position 105-120) wurden je 10 mg β -Kettenmaterial an ihren Asp-Pro - Bindungsstellen (Position 99-100) in 6 M Guanidin/ 70% Ameisensäure hydrolytisch gespalten (s.Kap. 3.6.2.). Die Trennung der Spaltprodukte erfolgte auf verschiedenen Wegen:

4.7.1. Trennung der Spaltprodukte: Pinguin

4.7.1.1. mittels HPLC über LiChrosorb RP 2 Material

Es wurde eine sehr kurze (4.6 x 25 mm) Säule verwendet, um zu erreichen, daß das sehr hydrophobe Pro-Peptid infolge geringerer Adsorption besser eluiert werden kann. Da nur geringe Mengen β -Kettenmaterial zur Verfügung standen, wurde zunächst mit einem Spaltansatz der α -Ketten (3 mg, s.Kap. 3.6.2.) experimentiert. Die Trennung mittels HPLC (s.Abb.24)



war trotz verschiedener Gradientenänderungen unbefriedigend; das Pro- Peptid war zu 30 % mit dem N - terminalen Ende der Ketten (im weiteren als N- Terminus bezeichnet) verunreinigt. Deshalb wurde von einem Trennungsversuch mit dem β - Kettenmaterial Abstand genommen.

4.7.1.2. mittels Blockierung des N- Terminus durch OPA (Orthophthaldialdehyd)

Die Blockierung wurde im Gasphasensequenzator durchgeführt. Im Spaltansatz der β - Ketten (3.6 nmol) wurden durch Zusatz des 1000fachen Überschusses an OPA (s.Kap. 3.7.2.) selektiv alle Aminogruppen blockiert. Die Iminogruppe des Prolins blieb dagegen frei für die Kupplungsreaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC), das Prolin konnte abgespalten werden. Da der nicht gebundene Überschuss an OPA durch Spülen mit Hexan/Benzol (S1) und Essigester (S2) (s.Kap. 3.9.2.) entfernt worden war, konnten die folgenden Aminosäuren des Pro-Peptides ungehindert abgebaut werden.

Da die Ausbeuten der Abbauschritte zu gering waren und ein rascher Anstieg des Backgrounds zu erwarten war, wurde der Lauf nach 4 Schritten abgebrochen (ohne Abb.)

4.7.1.3. mittels Gelfiltration über eine Sephadex G-50 fine Säule

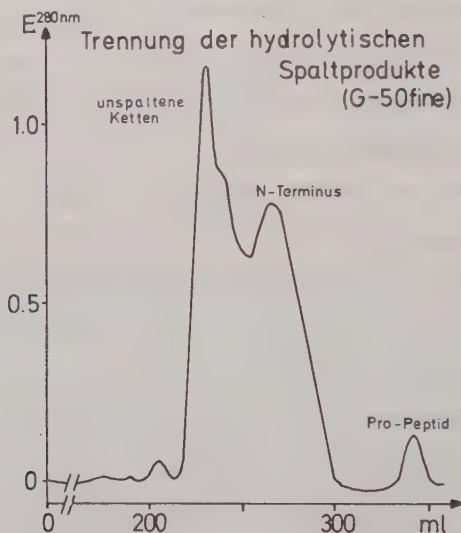


Abb.25 Säule: 2.6 x 170 cm
 Eluent: 8 M Harnstoff/ 10 % Ameisensäure
 Durchfluß: 20 ml/h (5 ml/Frakt.)
 Probe: hydrol.Spaltansatz (10 mg Protein)
 Detektion: UV, 280 nm

4.7.2. Trennung der Spaltprodukte Kormoran

4.7.2.1. mittels HPLC über Nucleosil C 4 Material

Es wurde ebenfalls eine kurze (4.6 x 25 mm) Säule verwendet (s.Kap.4.7.1.1.). Das Nucleosil-Material hat längere Seitenketten und ist sphärisch, weshalb es für größere Peptide und Ketten geeigneter als das irreguläre LiChrosorb RP 2 Material. Das Pro-Peptid liess sich aber trotz Variationen des Gradientenverlaufs nicht rein isolieren; es blieb eine Verunreinigung von etwa 40 % (s.Abb.26).

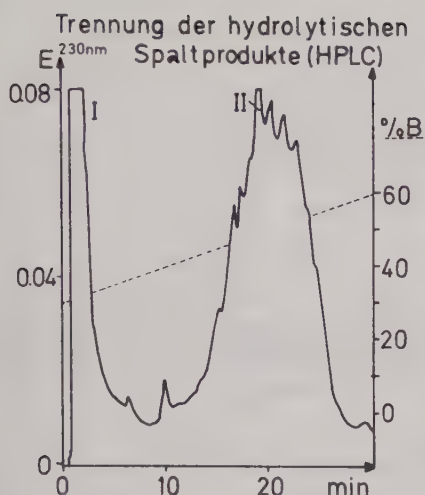


Abb. 26

Säule: 4.6 x 25 mm, Nucleosil C 4

Puffer A: 0.2 % TFA

Eluent B: Acetonitril

Durchfluß: 0.75 ml/min /

Raumtemperatur

Probe: hydrol. Spaltansatz (β -Ketten)

Gradient: Äquilibrieren mit 30 %B

in 30 min auf 60 %B

Detektion: UV, 230 nm

I = ungespaltene

Ketten +

N-Terminus

II = Pro-Peptid +

N-Terminus

4.7.2.2. mittels Gelfiltration über eine Sephadex G-50 fine Säule

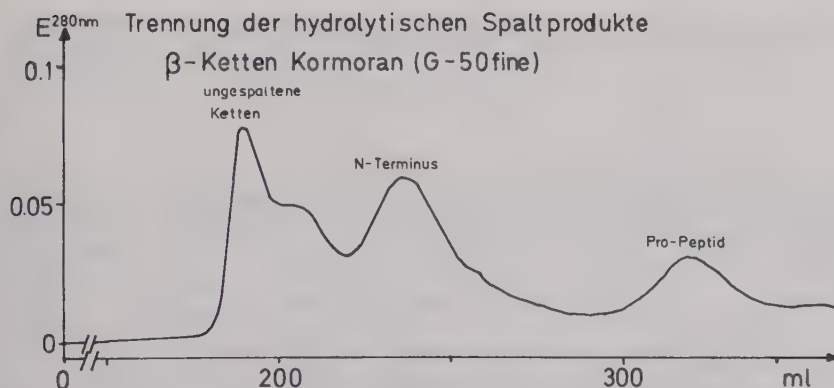


Abb. 27 Säule: 2.6 x 170 cm

Eluent: 8 M Harnstoff/ 10 % Ameisensäure

Durchfluß: 20 ml/h (5 ml/Frakt.)

Probe: hydrol. Spaltansatz (10 mg Protein)

Detektion: UV, 280 nm

Die Pro- Peptide von Pinguin und Kormoran wurden im Flüssigphasensequenzator (s.Kap.3.9.) 21 Schritte (Position 100-120) weit ansequenziert, wodurch überlappend die Sequenz des TP 12 (Position 105-120) ermittelt werden konnte.

(Analysen und Sequenz s.Kap.4.8.Tab.2,3(PI);5,7(KO))

4.8. Anhang: Analysen und Sequenzen

(TP = Tryptisches Peptid)

Tab.1: Analysen (α - Ketten Felsenpinguin)

Pos.1-7	TP 1 8-11	TP 2 12-16	TP 3 17-31	TP 4 32-40	TP 5 41-56	TP 6 57-60	TP 7 61	TP 8 62-82	TP 9A 83-90	TP 9B 91-92	TP 10 93-99	TP 11 100-127	TP 12 128-139	TP 13 140-141	ins. Kette	
Asp	2.15	1.03				1.06			3.02	1.01		1.99	1.16	1.10	12	11.3
Thr				0.99	3.06	0.98			1.00				1.05	1.04	8	7.2
Ser	1.07	1.02	1.05	1.86		1.02			1.01	0.91			2.05	1.06	11	9.0
Glx				4.01	1.05	1.06			1.08	1.07			2.27		10	9.8
Pro					0.98	0.98					0.99		2.26		5	4.7
Gly			1.09	0.99		1.07	0.97		1.04				1.13	1.04	7	6.95
Ala	1.02			2.06		1.12	0.93		5.94	0.96			3.32	1.11	16	16.2
Val	0.39*	0.80	0.90			0.85			0.99			1.95	1.94*	1.80	12	8.4*
Ile				0.99					1.76				0.65		4	3.8
Leu	1.07			1.04		1.18			2.06	1.99	1.21		5.49	1.89	15	13.8
Tyr				0.93	1.00	0.89									4	4.5
Phe			0.77		1.05	1.89						1.02	1.13	1.06	7	7.1
His				1.11		3.05	0.95		0.94	0.98			2.75		10	10.8
Lys	1.29	1.01	1.18		1.10	0.84	1.12	1.08	1.02	1.07		1.04	1.16	1.03	12	10.0
Arg				0.99							0.90				3	3.6
Cys													0.82	0.84	2	1.3
Met					0.75				0.90				0.79		3	2.5
Trp																0
Sum	7	4	5	15	9	16	4	1	21	8	2	7	28	12	2	141

* = entweder Val-Leu oder Val-Val Bindung

Tab.2: Analysen (β -Ketten Felsenpinguin)

Pos.	TP 1 1-8	TP 2 9-17	TP 3 18-30	TP 4 31-40	TP 5/6 41-61	TP 7 62-65	TP 8 66	TP 9A 67-76	TP 9B 77-82	TP 10/11 83-104	TP 13 121-132	TP 14A 133-135	TP 14B 136-143	TP 14C 144	TP 15 145-146	hydr. P 100-146	ges. Kett	
Asp			1.05		2.16			1.12	3.30	4.00	1.09					3.75	13	14.5
Thr		0.98		1.14				1.03		0.98	0.99					1.24	5	5.7
Ser	1.09				5.08			1.03		1.00							8	10.9
Glx	2.31	1.15	2.26	1.16						3.22	3.22					4.38	12	13.0
Pro				1.11	2.09					0.96	1.53						5	5.4
Gly		1.91	2.02		2.19	0.90		1.07								1.96	9	10.2
Ala	1.14		2.95		1.09	0.95		1.09		1.04	2.11		3.53			7.43	16	16.6
Val	0.62		1.95	0.56	0.74			1.75		0.88		0.84	0.86^			2.43^	12	6.9
Ile		0.85		0.53	0.82				0.79							1.18^	7	3.0
Leu		2.48	1.03	2.39	2.00		0.95			3.14		1.11	1.26			5.50	17	16.9
Tyr				0.90											0.91	0.50	2	2.5
Phe					3.12			1.01		1.98	0.98					3.30	8	8.2
His	1.58*					0.98				1.93			1.22		1.12	3.87*	7	9.5
Lys	1.22	0.94				1.15	0.97	0.95	0.92	0.99	1.03			0.97		3.51	10	9.8
Arg			0.97	1.19	0.84					1.05		1.05	1.13			2.49	6	5.3
Cys			0.73							0.77	0.99						3	2.6
Met					0.81				0.99								2	2.3
Trp	*	0.68		1.01							0.64					*	4	3.7
Sum	8	9	13	10	21	4	1	10	6	22	12	3	8	1	2	47	146	

* = His-Wert zu hoch, Trp ist miteingeschlossen

^ = Val-Val Bindung, bzw. Ile-Leu, Ile-Ile

Tab.3: Die Globinketten des Felsenpinguins
im homologen Vergleich mit den Ketten des Menschen

	NA	A										AB	B		
HU α		Pro Ala										Val-Gly-Ala 20			Gly
PI α	Val-	-Leu-Ser-Ala-Asn-Asp-Lys-Ser-Asn-Val-Lys-Gly-Val-Phe-Ser-Lys-Ile-Ser-Ser-His-Ala-Glu-Glu-Tyr-													
PI β	Val-His-Trp-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu-Ile-Thr-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-														-Asn-Val-Ala-Gln-Cys-
HU β		Leu-Thr-Pro													20 Asp-Glu-Val
	NA	A										B			

Tab.4: Analysen (α - Ketten Kormoran)

Pos.	TP 1 1-7	TP 2 8-11	TP 3 12- 16	TP 4 17- 31	TP 5 32- 40	TP 6 41- 56	TP 7 57- 60	TP 8 61	TP 9A 62-82	TP 9B 83-90	TP 10 91-92	TP 11 93-99	TP 12/13A 100-134	TP 13B 135- 139	TP 14 140- 141	ins.	Kette
Asp	1.08	1.10				1.09			3.18	1.00		1.99	1.56			10	10.3
Thr		1.12		0.97	2.02	1.03							2.27	0.93		8	8.2
Ser	1.89			1.00		1.03			0.97	0.91			1.32			7	6.8
Glx				3.21	1.16	1.13			1.07	1.08			1.43	1.07		9	10.5
Pro					0.83	0.85						0.89	1.99			5	5.0
Gly			1.09	2.82		1.07	1.01		1.06				1.33			8	8.4
Ala	1.14		1.16	3.04	1.09	1.14	1.00		6.99	0.97			3.89	1.03		21	20.5
Val	0.86	0.88	0.90	1.00					1.88			2.04	3.49*			13	11.9
Ile						0.76			1.78				0.69			4	3.3
Leu	0.90			1.02		1.05			1.98	2.05	1.02		6.38	0.98		15	15.2
Tyr				0.94	0.92	0.97									0.97	4	3.7
Phe			0.80		1.00	1.95						0.96	1.98			7	7.1
His						3.05	0.97		1.03	1.01			3.89			10	10.2
Lys	1.14	0.90	1.06		1.05	0.87	1.02	1.00	1.09	0.99		1.11	2.00	0.99		13	13.1
Arg				1.01							0.92				1.03	3	2.9
Cys																2	1.9
Met					0.93								1.74			2	1.7
Trp													0.63			0	0
Sum	7	4	5	15	9	16	4	1	21	8	2	7	35	5	2	141	

* = Val-Val Bindung

Tab.5: Analysen (β - Ketten Kormoran)

Pos.	TP 1 1-8	TP 2 9-17	TP 3 18- 30	TP 4 31- 40	TP 5/6 41-61	TP 7 62- 65	TP 8 66	TP 9A 67-76	TP 9B 77-82	TP 10 83-95	TP 11 96- 104	TP 13 121- 132	TP 14A+B 133-143	TP 14C 144	TP 15 145- 146	hydr. P 100- 146	ges. Kette
Asp			0.98		1.92				3.19	1.03	1.95	1.00				3.32	11
Thr	0.76	1.02		1.05	1.86			1.09		0.92		0.96				2.02	8
Ser					2.69			1.06		1.04							5
Glx	2.21	1.44	2.13	0.95				1.14		2.12	1.19	2.87				4.03	13
Pro				1.03	1.39						0.97	1.30				2.00	4
Gly		1.67	0.99		2.20	1.00		1.03					1.16			2.62	9
Ala	1.15		3.91		2.85	0.99		1.08		1.81		2.03	3.96			8.64	21
Val	0.64		1.93	(1)	1.08			1.60			0.89		1.79			2.86	11
Ile		0.85		(1)	1.08				0.74							1.11^	7
Leu		2.12	0.99	2.12	1.01			1.02	1.11	1.97	1.21		2.11			5.28^	17
Tyr				0.92													2
Phe					2.96			1.01		0.85	0.93	1.04			0.85	2.88	8
His	0.84				1.01					0.94	0.99		1.04		1.09	3.26	7
Lys	0.96	0.91			1.00	1.05	0.89	0.94	0.98			0.98		1.05		3.49	10
Arg			0.86	1.12	0.98						0.87		0.94			1.76	5
Cys			1.23							1.25		1.20				1.10	3
Met					0.88												1
Trp	(1)	(1)		0.88								0.50				(1)	4
Sum	8	9	13	10	21	4	1	10	6	13	9	12	11	1	2	47	146

^ = Ile-Ile, bzw. Ile-Leu Bindung

Tab.6: Analysen (α^D -Ketten Kormoran)

Pos.	TP 1/2 1-11	TP 3 12-16	TP 4A 17-21	TP 4B 22-31	TP 5A 32-38	TP 5B 39-40	TP 6 41-56	TP 7 57-61	TP 8 62	TP 9A 63-77	TP 9B/10 78-92	TP 11 93-99	TP 12 100-127	TP 13 128-139	TP 14 140-141	ins. Kette	
Asp				1.15			1.36	0.86		3.73	2.81	1.96	1.16			13	13.8
Thr	1.01			1.68		0.96	1.03			1.04	0.97		0.96	0.91		9	8.8
Ser			0.99				1.07				0.89					3	3.7
Glx	2.31	1.35	1.05	2.90			2.17			1.20	1.00		5.11	0.97		17	18.5
Pro					1.02		1.07					1.03	0.96			4	4.8
Gly	1.02	1.00		1.02			1.12	1.02		1.15			1.10			7	7.6
Ala	2.13		1.00							1.98	1.92		2.97	3.36^		14	13.9
Val	0.67	1.07	1.02		1.05					1.12*		1.94	4.69	1.16^		15	11.7
Ile							0.45			0.89						2	2.8
Leu	2.10			1.23	1.17		1.32			2.96	4.04		4.25	1.23*		18	17.4
Tyr					0.92		0.93				0.90		0.90		0.93	5	3.2
Phe					1.05		2.01					0.92	2.01	0.62		7	6.8
His							2.98	0.88			1.36		1.82			7	7.5
Lys		1.06	0.95		0.98	1.02		1.25	1.02			1.15	1.04	0.66		9	8.6
Arg	0.85			1.24			0.51			0.93	1.03				1.07	6	5.9
Cys													1.02			1	0.6
Met	0.91			0.80	0.82											3	2.6
Trp		0.53														1	(1)
Sum	11	5	5	10	7	2	16	4	1	16	15	7	28	12	2		141

* Val-Val Bindung

^ Werte zu niedrig, Integrationsfehler des Analysators

Tab.7: Die Globinketten des Kormorans

im homologen Vergleich mit den Ketten des Menschen

	NA	A		AB	B
HU α		Pro-Ala	10	Ala-Ala-Trp-Gly	Ala-His 21 Gly-Glu
KO α	A	Val- -Leu-Ser-Ala-Ser-Asp-Lys-Thr-Asn-Val-Lys-Gly-Val-Phe-Ala-Lys-Val-Gly-Gly-Ser-Ala-Glu-Ala-Tyr-			-Asn-Val-Ala-Glu-Cys-
KO β		Val-His-Trp-Thr-Ala-Glu-Lys-Gln-Leu-Ile-Thr-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-			20 Asp Val
HU β		Leu Pro Ser-Ala-Val Ala			
	NA	A		B	
			C		CD
HU α		Ala 30	Leu-Ser-Phe Thr 40		
KO α	A	Gly-Ala-Glu-Thr-Leu-Glu-Arg-Met-Phe-Thr-Ala-Tyr-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-			-Asp-Leu-
KO β		Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe-Phe-Ala-Ser-Phe-Gly-Asn-Leu-			Asp
HU β		Gly Gly 30 Val			
			C		CD
			E		
HU α	Ser 50		Val Gly 60	Asp Thr-Asn	
KO α	A	His-His-	-Gly-Ser-Ala-Gln-Ile-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Ala-Leu-Val-Glu-		
KO β		Ser-Ser-Ala-Thr-Ala-Ile-Thr-Gly-Asn-Pro-Met-Val-Arg-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Thr-Ser-Phe-Gly-Glu-			
HU β	49 Thr-Pro-Asp Val-Met		Lys 60 Lys-	Gly-Ala 71 Ser-Asp-	
	D		E		
			EF		FG
HU α	69 Val-Ala Val	Met-Pro-Asn 80	Ala	His 90	
KO α	A	Ala-Ala-Asn-His-Ile-Asp-Asp-Ile-Ala-Gly-Ala-Leu-Ser-Lys-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-Gln-Lys-Leu-Arg-Val-			
KO β		Ala-Val-Lys-Asn-Leu-Asp-Asn-Ile-Lys-Ala-Thr-Phe-Ala-Gln-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-			
HU β		Gly-Leu-Ala-His 80 Leu Gly Thr 90			
			F		FG
			G		GH
HU α		100 Ser Leu Thr-Leu 110 Ala Leu Ala-Glu-Phe			
KO α	A	Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Gly-His-Cys-Phe-Leu-Val-Val-Val-Ala-Ile-His-His-Pro-Thr-Leu-Leu-Thr-			
KO β		Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asp-Ile-Leu-Ile-Ile-Val-Leu-Ala-His-Phe-Ala-Lys-Asp-Phe-Thr-			
HU β		100 Asn-Val 110 Val-Cys His Gly 120 Glu			
			G		GH
					H
					HC
HU α	119 Ala	Leu-Ala-Ser Ser-Thr-Val Ser 140			
KO α	A	Pro-Glu-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Met-Cys-Ala-Val-Ala-Lys-Glu-Leu-Thr-Ala-Lys-Tyr-Arg			
KO β		Pro-Glu-Cys-Gln-Ala-Ala-Trp-Gln-Lys-Leu-Val-Gly-Ala-Val-Ala-His-Ala-Leu-Ala-Arg-Lys-Tyr-His			
HU β		Pro-Val 129 Tyr Val Ala-Gly Asn 140 His			
					HC

Abkürzungen: KO = Kormoran

HU = Mensch

Die Unterschiede der Ketten des Kormorans zu den α A- und β - Ketten des Menschen sind eingetragen. Die Lage der Helices ist eingezeichnet (--).

5. Diskussion

5.1. Grundlagen

Den strukturanalytischen Untersuchungen wurde das von M.F.Perutz 1960 aufgeklärte und 1984 verfeinerte Röntgenstrukturmodell des humanen Deoxyhämoglobins zu Grunde gelegt. Für die Darstellung der Verhältnisse der Wechselwirkungen in der Oxyform wurde die ebenfalls von Perutz et al. aufgeklärte Röntgenstruktur des Methämoglobins des Pferdes benutzt. Die folgenden Tabellen I - IV (entnommen aus dem Atlas of Molecular Structures von Perutz & Fermi 1981) zeigen die für die Struktur und Funktion des Hämoglobins wichtigsten Bindungsstellen.

I. Hämbindungsstellen

(Vergleich Human Deoxy mit bisher veröffentlichten Vogelsequenzen) (nach Kleinschmidt & Sgouros 1987)

Tab.I

Position	α - Ketten			β - Ketten	
	Hu	Vögel		Hu	Vögel
		A	D		
C7	Y	Y	Y	F	F
CD1	F	F	F	F	F
CD3	H	H	H	S	S
CD4	F	F	F	F	F
E7	H	H	H	H	H
E10	K	K	K	K	K
E11	V	V	V	V	V
E14	A	A	A	A	S
E15	L	L	L	F	F
F1	L	L	L,M	F	F
F4	L	L	L	L	L
F7	L	L	L	L	L
F8	H	H	H	H	H
FG3	L	L	L	L	L
FG5	V	V	V	V	V
G4	N	N	N	N	N
G5	F	F	F	F	F
G8	L	L	L	L	L
H15	V	V	V	V	V
H19	L	L	L	L	L

Bei den Vögeln sind α A- und α D-Ketten angegeben.

Die Hämkontakte sind, bis auf zwei Ausnahmen, bei allen bis jetzt sequenzierten Vögeln (s.Tab. VI) konservativ. Der Austausch β E14 A $\rightarrow$ S bei allen Vögeln (Ein-Punkt-Mutation) führt eine polare anstelle einer unpolaren Seitenkette ein, was für die Hämbindung aber keine Bedeutung hat. Der Austausch α D F1 L $\rightarrow$ M bei Huhn (Oberthür et al. 1984) und Fasan (Braunitzer et al. 1982) ist auf Grund der Ähnlichkeit der Aminosäuren bedeutungslos.

II. $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen

(Vergleich Human Deoxy mit bisher veröffentlichten Vogelsequenzen)(nach Kleinschmidt & Sgouros 1987)

Tab.II Deoxy - Form
(Vereinfachte Darstellung der Wechselwirkungen)

Position	Hu	α_1	β_1	Hu	Position
		Vögel A,D	Vögel		
31 B12	R	R,R	Q'	Q	H9 131
34 B15	L	*,*	A	A	H6 128
35 B16	S	*,*	Q	Q	H5 127
36 C1	F	*,*	*	P	H3 125
103 G10	H	*,Q	P	P	H2 124
106 G13	L	L, *	#	T	H1 123
107 G14	V	V,V	F	F	GH5 122
110 G17	A	A,A	*	G	GH2 119
111 G18	A	*,*	A	H	G18 116
114 GH2	P	P,G	A	A	G17 115
117 GH5	F	L,Y	*	C	G14 112
118 H1	T	T, #	D	N	G10 108
119 H2	P	P^, P	L!	M	D6 55
122 H5	H	H,H	Y	Y	C1 35
123 H6	A	A, *	V	V	B16 34
126 H9	D	D,D	I	V	B15 33
			R	R	B12 30

Zeichenerklärung:

- * = bei vielen Vögeln variabel
- # = bei vielen Vögeln variabel, aber strukturell ähnliche Aminosäuren
- ^ = eine Ausnahme: Streifengans α 119 A
- ' = eine Ausnahme: Storch β 131 K
- ! = zwei Ausnahmen: Storch β 55 T;
Andengans β 55 S

Hu = Human Hb

Für die Vögel sind α A- und α D-Ketten angegeben.

Diese Bindungsstellen dienen der Bildung der Dimeren und beruhen, wie auch die $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen, zum Teil auf Van der Waals- Wechselwirkungen. Als Bindungsstellen wurden im Perutz'schen Modell alle Reste bezeichnet, bei denen die Entfernung der Atome unter 4 Å liegt. Über größere Entfernungen kann durch Einlagerung von H_2O -Molekülen eine Bindung aufgebaut werden. $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen haben eine relativ hohe Mutationsrate, was darauf schließen läßt, daß ihre Bedeutung für die Funktion nicht so groß ist. Die Änderungen zwischen Deoxy- und Oxyform sind nur gering.

III. $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen

(Vergleich Human Deoxy mit bisher veröffentlichten Vogelsequenzen)(nach Kleinschmidt & Sgouros 1987)

Tab.III Deoxy - Form
(Vereinfachte Darstellung der Wechselwirkungen)

Position	α_1		β_2		Position
	Hu	Vögel A,D	Vögel	Hu	
37 C2	P	P,P	H	H	HC3 146
38 C3	T	*,*	Y	Y	HC2 145
40 C5	K	K,K	L	L	G7 105
41 C6	T	T,T	N	N	G4 102
42 C7	Y	Y,Y	E	E	G3 101
44 CD2	P	P,P	P	P	G2 100
88 F9	A	A^,A	D	D	G1 99
91 FG3	L	L,L	V	V	FG5 98
92 FG4	R	R,R	H	H	FG4 97
94 G1	D	D,D	*	E	CD2 43
95 G2	P	P,P	F	F	C7 41
96 G3	V	V,#	R	R	C6 40
97 G4	N	N,N	W	W	C3 37
140 HC2	Y	Y,Y	P	P	C2 36
141 HC3	R	R,R	Y	Y	C1 35
			V	V	B16 34

Zeichenerklärung:

* = s. Tab.II # = s. Tab.II Hu = Human Hb

^ = eine Ausnahme: Flamingo α 88 Q

Für die Vögel sind α A- und α D-Ketten angegeben

Die Verbindung der Dimere zum Tetramer ist funktionell von großer Bedeutung. Die bei der Oxygenierung des Hämoglobins stattfindende Molekülbewegung wird durch einen Wechsel der $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen bewirkt. Die Mutationsrate ist entsprechend der Bedeutung für die Funktion geringer.

IV. Phosphatbindungsstellen

(Vergleich Human mit bisher veröffentlichten Vogelsequenzen)

(nach Kleinschmidt & Sgouros 1987)

Tab.IV				
Position		Human (2,3 DPG)	Vögel (IPP)	
β	1 NA1	V	V	
β	2 NA2	H	H,Q*	
β	82 EF6	K	K	
β	135 H13	-	R	
β	139 H17	-	H	
β	143 H21	H	R	

Die Polyphosphate (2,3 DPG bei Säugern; IPP bei den Vögeln) werden über mehrere Bindungsstellen in einer von den β -Ketten gebildeten Tasche fixiert.

Bei den Vögeln sind nach Perutz (1983) zwei Bindungsstellen mehr für den allosterischen Effektor Phosphat vorhanden.

*Der Austausch β NA2 H $\rightarrow$ Q bei Feldsperling (Schneegans et al. 1985), Star (Oberthür et al. 1984), Strauß und Nandu (Oberthür et al. 1983) bewirkt eine verringerte Phosphatbindungsfähigkeit, da die stark positive Gruppe des Histidins durch die schwach polare Seitenkette des Glutamins ersetzt wird.

Der Vergleich der Vogelprimärstrukturen mit dem Röntgenstrukturmodell des menschlichen Hämoglobins ist nach Chothia und Lesk (1986) in Grenzen zulässig, solange die Sequenzhomologie über 50 % liegt. Homologe Proteine zeigen die größte Sequenzdivergenz an der Oberfläche des Moleküls, ohne daß dadurch die Struktur oder Funktion wesentlich beeinflußt wird. Sind die für die Faltung wichtigen Regionen (common core = Hämbindungsstellen; $\alpha_1\beta_1$ -, $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen) konserviert, bleibt die Funktion erhalten.

Tab.V

Vögel mit veröffentlichten Hämoglobinsequenzen
(nach Kleinschmidt & Sgouros 1987)

Nandu (*Rhea americana*)
 Strauß (*Struthio camelus*)
 *Storch (*Ciconia ciconia*)
 Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*)
 Spaltfußgans (*Anseranas semipalmata*)
 Höckerschwan (*Cygnus olor*)
 Graugans (*Anser anser*)
 Streifengans (*Anser indicus*)
 Kanadagans (*Branta canadensis*)
 Pekingente (*Anas platyrhynchos*)
 Stockente (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*)
 Moschusente (*Cairina moschata*)
 Andenkondor (*Vultur gryphus*)
 Steinadler (*Aquila chrysaetos*)
 Huhn (*Gallus gallus*)
 Fasan (*Phasianus colchicus colchicus*)
 *Ararauna (*Ara ararauna*)
 Feldsperling (*Passer montanus*)
 Gemeiner Star (*Sturnus vulgaris*)

Zeichenerklärung: * = Vogel, bei denen keine
 α D - Ketten gefunden wurden.

5.2. Felsenpinguin

5.2.1. Biologie des Felsenpinguins

Der Felsenpinguin (*Eudyptes crestatus*) gehört nach der Systematik von H.E.Wolters (1975-1982) in die Ordnung Sphenisciformes (Pinguine), Familie Spheniscidae (Pinguine), Gattung *Eudyptes* (Schopfpinguine). Nach Stonehouse (1976) sind die Pinguine am ehesten mit den Procellariiformes (Röhrennasen) verwandt, morphologisch ähneln sie aber mehr den auf der Nordhalbkugel lebenden Alcidae (Alke, Lummern). Die Pinguine kommen nur auf der Südhalbkugel vor und sind dort auf die kälteren wie auf die wärmeren Regionen verteilt. Der Felsenpinguin lebt vorwiegend auf Inseln in der Subantarktis und auf Feuerland.

Pinguine sind seit Jahrmillionen - wie Fossilfunde von vor 55 - 25 Mio. Jahren (Ende Kreide bis frühes Tertiär) (Stonehouse 1976) zeigen - optimal an das Leben im Wasser angepaßt, wobei sie allerdings schon früh ihre Flugfähigkeit eingebüßt haben. Körper und Extremitäten sind so gebildet, daß sie im Wasser möglichst wenig Widerstand erzeugen, was die Fortbewegung im Wasser erleichtert. Die Flügel werden unter Wasser als Ruder eingesetzt. Pinguine sind (nach Scholander 1940) keine guten Langstrecken- oder Tieftaucher. Die Tauchdauer beträgt maximal 6 - 7 min, die Tauchtiefe (nach Stonehouse 1976) liegt bei 10 - 20 m. Da die Pinguine aber nach einem Tauchgang sehr tief und frequent durchatmen können, ist es ihnen möglich, die Erholungsphase sehr zu verkürzen und häufige, rasch aufeinanderfolgende Tauchgänge mit imposanter Schnelligkeit durchzuführen (nach Scholander 1940).

5.2.2. Sequenzanalyse

Im Blut des Felsenpinguins wurde eine Komponente ($\alpha_2\beta_2$) gefunden.

<u>Übersicht A:</u>		α - Ketten	
Homologie zu Human Hb:		68.8 % = 44 Austausche	
Homologie des common core (53 Bindungsstellen):		85.0 % = 8 Austausche	
Hämbindungsstellen:		keine Austausche	
$\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen:			
Position	Hu	Pi	Bedeutung
34 B15	L $\rightarrow$ T		+ OH-Gruppe
35 B16	S $\rightarrow$ T		bei einigen Vögeln
36 C1	F $\rightarrow$ Y		bei vielen "
103 G10	H $\rightarrow$ Q		" " "
111 G18	A $\rightarrow$ I		" " "
115 GH3	A $\rightarrow$ S		" " "
117 GH5	F $\rightarrow$ L		" allen "
keine			
$\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen:			
38 C3	T $\rightarrow$ Q		bei vielen Vögeln - OH-Gruppe

<u>Übersicht B:</u>		β - Ketten	
Homologie zu Human Hb:		67.8 % = 47 Austausche	
Homologie des common core (62 Bindungsstellen):		84.0 % = 10 Austausche	
Hämbindungsstellen:		E14 A $\rightarrow$ S (s.Tab.I)	
$\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen:			
Position	Hu	Pi	sonstiges Vorkommen Bedeutung
33 B15	V $\rightarrow$ I		bei allen Vögeln längere Seitenk.
55 D6	M $\rightarrow$ L		bei vielen " keine
108 G10	N $\rightarrow$ D		bei allen " + negative Ldg.
112 G14	C $\rightarrow$ I		bei vielen " - SH-Gruppe
116 G18	H $\rightarrow$ A		bei allen " - positive Ldg.
119 GH2	G $\rightarrow$ A		bei einigen " längere Seitenk.
125 H3	P $\rightarrow$ E		bei " " + H-Brücke
131 H9	Q $\rightarrow$ E		Pinguin + negative Ldg.
$\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen:			
43 CD2	E $\rightarrow$ S		bei einigen Vögeln - Salzbrücke
Phosphatbindungsstellen:		keine Austausche	

Die unter Bedeutung aufgeführten Bemerkungen versuchen, die Veränderungen der Reste und/oder die möglichen Folgen der angegebenen Austausche (Grundlage Atlas of Molecular Structures, Perutz & Fermi 1981) zu erfassen.

+ OH-Gruppe = bedeutet in der Regel Ausbildung von H-Brücken durch Einführen einer OH-Gruppe

+/- H-Brücke = Entstehen/Verlust einer H-Brücke durch Einführen einer polaren Aminosäure

längere Seitenketten (mit gleichen chemischen Eigenschaften) = bedeutet Erhalt oder Verbesserung der Bindungsstelle

keine Bedeutung = infolge struktureller Verwandtschaft der ausgetauschten Aminosäuren

+/- Salzbrücke = bedeutet Gewinn/Verlust einer Salzbrücke und damit Stärkung/Schwächung der Bindungsstelle

+/- negative/positive Ladung = bedeutet eine Beeinflussung der Bindungsstelle durch Veränderung der Ladungsverhältnisse

Hu = Human Hb Pi = Pinguin Hb

* = Austausch wird im folgenden diskutiert

Alle in Übersicht A und B dargestellten Austausche sind mit Ausnahme des Austausches β 131 Q $\rightarrow$ E statistisch über alle bisher sequenzierten Spezies verteilt. Die mögliche Bedeutung ist rein spekulativ, da oft nicht die Seitengruppen der Aminosäuren, sondern die Kohlenstoff- oder Stickstoffatome der Peptidbindungen an den Bindungen beteiligt sind, sodaß die Seitenketten nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Zur genaueren Klärung ihrer Bedeutung wäre ein Röntgenstrukturmodell analog dem des humanen Hämoglobins notwendig. Bis jetzt wurde aber ein solches für Vogelhämoglobin noch nicht erstellt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Modellierung von Molekülen per Computer. Eines der hierzu von Jones (1985) entwickelten Programme heißt FRODO. Wenn ein vollständiges graphisches Molekülmodell und die Röntgenstruktur eines Proteins (wie hier das Hämoglobin) bekannt ist, können nach Jones homologe Proteine (wie hier die Vogelhämoglobine) durch Projektion der Sequenz auf das graphische Modell verglichen werden. Durch Einbau von an wichtigen Positionen befindlichen Austauschungen kann untersucht werden, ob diese die Struktur und damit eventuell auch die Funktion beeinträchtigen. Durch Messung der Atomabstände kann festgelegt werden, ob Seitengruppe oder Hauptkette an einer Bindungsstelle beteiligt sind. Durch Veränderung der Atomabstände oder/und der Polarität beziehungsweise der Ladungsverhältnisse können Wechselwirkungen wegfallen oder gefestigt werden. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Proteins sind aber nicht erfaßbar. Da für die α - Ketten des Pinguins 85 %, für die β - Ketten 84 % der invarianten, konservativen Bereiche (common core) homolog zum humanen Hämoglobin sind, sind solche Vergleiche nach Chothia & Lesk (1986) in Grenzen zulässig.

*Der Austausch β 131 Q $\rightarrow$ E ($\alpha_1\beta_1$), der nur in der Sequenz des Felsenpinguins auftritt, wurde an einem Molecular Graphics Display, Evans & Sutherland PS 300 mit Hilfe des Programms FRODO untersucht. β 131 E tritt in Wechselwirkung mit α 35 T, α 36 Y und vor allem mit α 103 Q. Im Vergleich zur Konstellation dieser Bindungsstelle im Humanhämoglobin

Hu β 131 Q $\leftrightarrow$ α 103 H

Pi β 131 E $\leftrightarrow$ α 103 Q

stellte sich heraus, daß diese wegen der konstantgebliebenen Größenverhältnisse und Ladungsverteilung (die positive Ladung des Histidins wird gegen die negative Ladung des Glutamins ersetzt) der an der Bindungsstelle beteiligten Seitenketten nicht beeinflußt wird. Der Austausch β 131 Q $\rightarrow$ E wurde auch beim abnormalen Human Hb Cambden gefunden, der Phänotyp ist aber normal.

5.2.3. Physiologische Daten:

Nach Messungen von Lenfant et al. (1969) ergibt sich für den Adeliepinguin (*Pygoscelis adeliae*) ein P_{50} -Wert von 34.6 mm Hg (pH 7.4; PCO_2 = 48 mm Hg; T = 38.5°C) im Vollblut. Im Vergleich mit den P_{50} -Werten einiger anderer Vögel (Lenfant 1969) zeigt der Adeliepinguin eine höhere Sauerstoffaffinität als Ente, Taube, Huhn und Fasan, aber eine niedrigere Affinität als die Säuger. Der Hill-Koeffizient lag bei 2.9.

Messungen von A.G.Schnek, Brüssel (persönliche Mitteilung) ergaben einen P_{50} -Wert von 16.2 mm Hg (pH 7.4 Phosphatpuffer, T = 37°C) im Vollblut des Felsenpinguins. Der Hill-Koeffizient lag bei 2.2. Diese Ergebnisse bedeuten, daß die Sauerstoffaffinität des Pinguins auch größer ist als die der Säuger (Human P_{50} 26.8 mm Hg (Wert nach Stryer 1983)).

Sauerstoffaffinitätsmessungen zeigen oft sehr unterschiedliche Ergebnisse in den einzelnen Laboratorien für die

gleichen Spezies. Dies ist nach Mehner et al. (1983) auf die unterschiedlichen Meßverfahren, Versuchsbedingungen, Proben und verschiedene andere Parameter zurückzuführen.

Die Auswirkungen der organischen Phosphate auf die Sauerstoffaffinität des Pinguins (*Aptenodytes forsteri*) wurde von Vandecasserie et al. (1973) beschrieben:

Tabelle A:
(pH 7.0, 0.025 M TrisHCl, 0.1 M NaCl, T = 20°C)

	- IP6	+ IP6	ΔP_{50}
	mm Hg	mm Hg	mm Hg
Huhn	1.1	38	36.9
Truthahn	4.0	32	28
Fasan	4.2	25	20.8
Ente	3.8	32	28.2
Taube	4.7	25	20.3
Ara	13.8	37	23.2
Pinguin	17.8	32	14.2

ΔP_{50} stellt die Größe des Phosphateinflusses auf die Hämoglobine dar. Mathematisch definiert es den Abstand der beiden Wendepunkte der O_2 -Dissoziationskurven mit und ohne Phosphat. Je größer der Abstand, desto stärker ist die Wirkung des Effektors.

Es ist auffällig, daß der Phosphateinfluß beim Pinguin sehr viel geringer ist als bei den anderen Spezies. Auch die vergleichsweise niedrige Affinität des phosphatfreien Hämoglobins ist bemerkenswert, der Wert deckt sich nahezu mit dem Wert des Felsenpinguin-Vollblutes.

Da die Vögel einer Familie in den Primärstrukturen ihrer Hämoglobine sehr homolog sein dürften, ist anzunehmen, daß sich die genannten Pinguingattungen in den wichtigen Positionen ihrer Sequenzen nicht von denen des Felsen-

penguins unterscheiden. Aus dessen Sequenz läßt sich aber weder für die hohe Sauerstoffaffinität noch für den geringen Phosphateinfluß eine Erklärung finden.

1972 wiesen Johansen & Lenfant auf eine wichtige Besonderheit in der Entwicklung der Pinguine hin. Sie zeigten am Beispiel des Adeliepingvins, daß der für gewöhnlich bei anderen Vogelarten auftretende Anstieg des IPP's (Bartels et al. 1966) in der Jungvogelzeit und die damit verbundene Affinitätssenkung nicht auftrat. Nach einem kurzfristigen Phosphatanstieg nach dem Schlupf sank der Phosphatspiegel innerhalb von acht Wochen (= Entwicklungsdauer zum tauchfähigen Tier) wieder ab. Die tauchfähigen Tiere haben also eine hohe Sauerstoffaffinität. Nach Lenfant et al. (1969) findet man außerdem bei erwachsenen Tieren eine stark erhöhte Pufferkapazität im Blut, einen niedrigen Bohr-Effekt und eine gesteigerte Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyt.

Auf Grund von physiologischen und molekularbiologischen Anpassungsmechanismen ist also eine erhöhte Sauerstofftransportkapazität des Hämoglobins und eine optimale Ausnutzung des Sauerstoffs im Gewebe unter hypoxischen Bedingungen gewährleistet, ohne daß die Primärstruktur des Hämoglobins eine besondere Eignung aufweist.

5.3. Kormoran

5.3.1. Biologie des Kormorans

Der Kormoran (*Phalacrocorax carbo*) gehört nach Wolters (1975-1982) systematisch in die Ordnung Pelecaniformes (Ruderfüßer), Unterordnung Pelecani (Pelikanartige), Familie Phalacrocoracidae (Kormorane, Scharben), Gattung *Phalacrocorax* (Kormorane). Übereinstimmend mit Wolters sind nach Van Tets (1976) die nächsten Verwandten der Kormorane die Familie der Anhingidae (Schlangenhalsvögel); nach Wolters (1975-1982) gehören auch noch die Familien der Sulidae (Tölpel) und der Pelecanidae (Pelikane) in die gleiche Unterordnung.

Nach Van Tets (1976) kommen die Kormorane auf der ganzen Erde vor. Besonders an den Westküsten Südamerikas und Südafrikas siedeln sie zu Tausenden und produzieren den für den Menschen wichtigen Guano, der als Düngemittel für die Landwirtschaft außerordentlich begehrt ist.

Nach Fisher & Peterson (1972) wurden in der Hornerstown-Formation, New Jersey (Kreide) etwa 68 - 66 Millionen Jahre alte Vogelfossilien gefunden, die die ersten Vertreter der modernen Kormoranfamilie darstellen.

Die Kormorane sind an ihren Lebensraum Wasser in etwas anderer Weise, aber ebenso gut wie die Pinguine angepasst. Da sie noch flugfähig sind, sind die Knochen mit - wenn auch kleinen - Lufträumen ausgestattet. Ihr Gefieder ist wasserdurchlässig, sodaß beim Tauchen die Luft zwischen den Federn entweichen kann und der Auftrieb vermindert wird. Die Fortbewegung unter Wasser erfolgt durch ein Rückwärtsstoßen der kräftigen Füße, ohne daß die Flügel eingesetzt werden. Die Tauchtiefe beträgt 1 - 3 m, die Tauchdauer 0.5 - 1 min (nach Van Tets 1976).

5.3.2. Hämoglobinkomponenten -

Das Auftreten des Hb D's bei Vögeln

Im Blut des Kormorans wurden zwei Komponenten - wie bei den meisten der bisher untersuchten Vögel - gefunden, während der Pinguin nur eine Komponente besitzt. Nach Saha & Gosh (1965), Schnek et al. (1978), und Giardina et al. (1985) werden für den *Phalacrocorax carbo* drei Komponenten beschrieben, die sich als zwei Hauptkomponenten gleicher und eine Minorkomponente von geringerer Konzentration darstellen. Die verwendeten Trennungsmethoden (Papierelektrophorese, Isoelektrische Focussierung) sind sehr ungenau für Hämoglobine, da oft Artefakte vor allem durch Oxidationsprodukte entstehen. Die Ergebnisse sollten daher mit Vorsicht verwendet werden.

Das Verhältnis der Komponenten des in dieser Arbeit untersuchten Kormorans betrug etwa 83 : 17 % Hb A : Hb D, was im Bereich der für die anderen Vögel von Baumann et al. (1984) angegebenen Konzentrationsverhältnisse von 85-70 % : 15-30 % (Hb A : Hb D) liegt. Nach Mehner und Hartfiel (1983) variiert das Verhältnis der Komponenten aber während der Jugendentwicklung und von Spezies zu Spezies, sodaß es vorstellbar ist, daß in bestimmten Altersgruppen zum Beispiel kein Hb D mehr auftritt. Auch Washburn (1968) beschrieb den Einfluß des Alters auf das Auftreten von Minorkomponenten. Mit steigendem Alter reduzierte sich die Konzentration der Minorkomponenten ständig. So kann auch für den Pinguin nicht

verbindlich die Existenz einer Hb D- Komponente abgelehnt werden.

Genaue Abklärung wäre nur über eine Untersuchung des genetischen Hintergrundes zu erreichen. Ein Gen für eine entsprechende α D-Kette kann vorhanden sein, ohne ständig exprimiert zu werden. Das Auftreten und die Funktion des Hb D's zu klären, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

5.3.3. Sequenzanalyse:

Übersicht C: α A-Ketten

Homologie zu Human Hb: 67.4 % = 46 Austausche

Homologie des common core
(53 Bindungsstellen): 86.8 % = 7 Austausche

Hämbindungsstellen: keine Austausche

 $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen:

Position	Hu	Ko	sonstiges Vorkommen	Bedeutung
34 B15	L → T		bei einigen Vögeln	s.Pinguin α
35 B16	S → A		" " "	- H-Brücke
36 C1	F → Y		" vielen "	s.Pinguin α
111 G18	A → I		" " "	s.Pinguin α
115 GH3	A → T		Kormoran	+ OH-Gruppe
117 GH5	F → L		bei allen Vögeln	s.Pinguin α

 $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen:

38 C3	T → Q		bei vielen Vögeln	s.Pinguin α
-------	-------	--	-------------------	--------------------

Übersicht D: α D-Ketten

Homologie zu Human Hb: 53.9 % = 65 Austausche

Homologie des common core
(53 Bindungsstellen): 81.1 % = 10 Austausche

Hämbindungsstellen: keine Austausche

 $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen:

Position	Hu	Ko	sonstiges Vorkommen	Bedeutung
35 B16	S → V		Kormoran	- H-Brücke
36 C1	F → Y		bei allen Vögeln	s.Pinguin α
103 G10	H → Q		" " "	s.Pinguin α
106 G13	L → Q		" vielen "	+ H-Brücke
111 G18	A → V		" " "	keine
114 GH2	P → G		" allen "	kürzere Seitenk.
115 GH3	A → Q		Kormoran	+ H-Brücke
117 GH5	F → Y		bei allen Vögeln	+ OH-Gruppe
123 H6	A → V		Kormoran	keine

 $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen:

38 C3	T → K		Kormoran	+ Salzbrücke*
-------	-------	--	----------	---------------

Übersicht E: β -Ketten

Homologie zu Human Hb: 69.2 % = 45 Austausche
 Homologie des common core
 (62 Bindungsstellen): 85.5 % = 9 Austausche

Hämbindungsstellen: E14 A $\rightarrow$ S (s.Tab.I)

$\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen:

Position	Hu	Ko	sonstiges Vorkommen	Bedeutung
33 B15	V $\rightarrow$ I		bei allen Vögeln	s.Pinguin β
55 D6	M $\rightarrow$ T		Kormoran, Storch	- Bindungsstelle*
108 G10	N $\rightarrow$ D		bei allen Vögeln	s.Pinguin β
112 G14	C $\rightarrow$ I		" vielen "	s.Pinguin β
116 G18	H $\rightarrow$ A		" allen "	s.Pinguin β
119 GH2	G $\rightarrow$ A		" einigen "	s.Pinguin β
125 H3	P $\rightarrow$ E		" " "	s.Pinguin β

$\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen:

43	CD2	E $\rightarrow$ A	bei vielen Vögeln	- negative Ldg.
----	-----	-------------------	-------------------	-----------------

Phosphatbindungsstellen:

135	H13	A $\rightarrow$ G	Kormoran (bei allen anderen Vögeln: R)	- Bindungsstelle*
-----	-----	-------------------	---	-------------------

Erklärung der Bedeutungen: s.Kap.5.2.2.Pinguin!

- Bindungsstelle = Verlust einer Bindungsstelle

Hu = Human Hb Ko = Kormoran Hb

* = Austausch wird im Folgenden diskutiert

Neben den statistisch verteilten Austauschen sind einige beschrieben worden, die nur im Hämoglobin des Kormorans auftreten und in Hinsicht auf seine Tauchfähigkeit von Wichtigkeit sein könnten. Drei dieser Austausche* wurden an einem Molecular Graphics Display, Evans & Sutherland PS 300 mit Hilfe des Programms FRODO (s.auch 5.2.2. Pinguin) eingehender untersucht.

Im folgenden sollen diese Austausche mit ihrer möglichen Bedeutung für die Funktion des Hämoglobins an Hand der Computergraphik als Beispiele für Veränderungen an Bindungsstellen diskutiert werden.

*** 38 C3 T(Hu) $\rightarrow$ K $\alpha_1\beta_2$ Kormoran α D
 55 D6 M(Hu) $\rightarrow$ T $\alpha_1\beta_1$ Kormoran β
 135 H13 A(Hu) $\rightarrow$ G Phosphatbdgst. Kormoran β

Der Austausch 38 C3 T(Hu) $\rightarrow$ K α D Kormoran bringt zum einen eine wesentlich längere Seitenkette, zum anderen eine positive Ladung in die Bindungsstelle ein. Da der Rest α 38 beim humanen Hämoglobin mit β 100 Prolin und β 99 Asparaginsäure durch H-Brücken unter Einlagerung von H_2O - Molekülen in Wechselwirkung steht, wird durch das Auftreten eines Lysins an dieser Stelle die Ausbildung einer Salzbrücke α 38 $K^+ \leftrightarrow \beta$ 99 D^- begünstigt, sodaß eine Stabilisierung dieser Bindungsstelle in der Deoxyform eintritt.

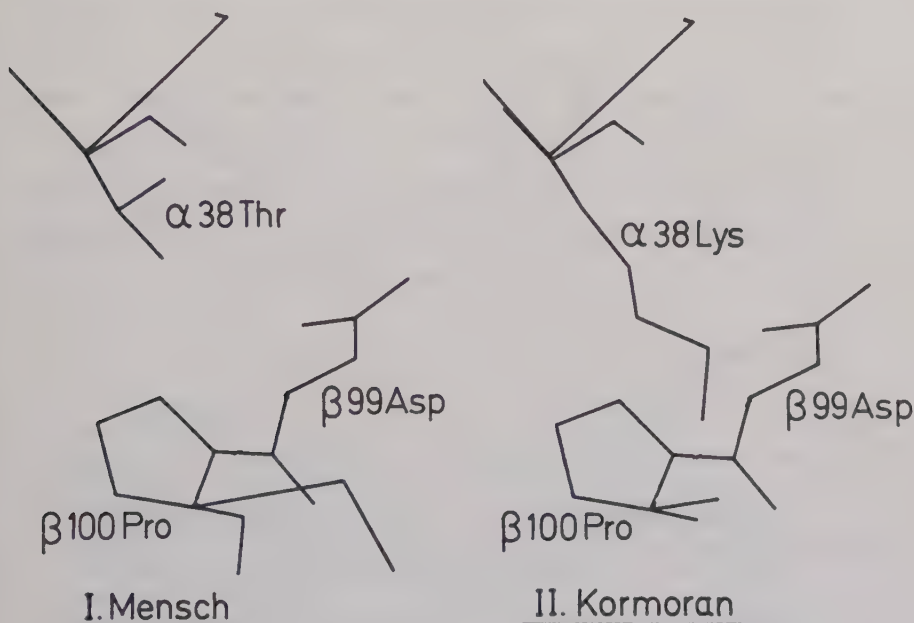


Abb. I. + II.

Graphische Darstellung der α, β_2 - Bindungsstelle α 38 $\leftrightarrow$ β 99, 100 des Hb A des Menschen (I) und Hb D des Kormorans (II). Durch Ausbildung einer Salzbrücke zwischen α 38 Lys und β 99 Asp beim Hämoglobin des Kormorans wird die Bindungsstelle in der Deoxyform stabilisiert.

Der Austausch 55 D6 M(Hu) $\rightarrow$ T β Kormoran, der auch in der Sequenz der Störches zu finden ist, ersetzt eine unpolare durch eine polare Aminosäure, deren Seitenkette außerdem wesentlich kürzer ist als die des Methionins. Diese Bindungsstelle (β 55 M $\leftrightarrow$ α 119 P) beruht im humanen Hämoglobin auf einer hydrophoben Wechselwirkung. Die Bindungsstelle wird infolge der vergrößerten Entfernung der an der Wechselwirkung beteiligten Atome unterbrochen. Dies führt zu einer Destabilisierung der Deoxyform.

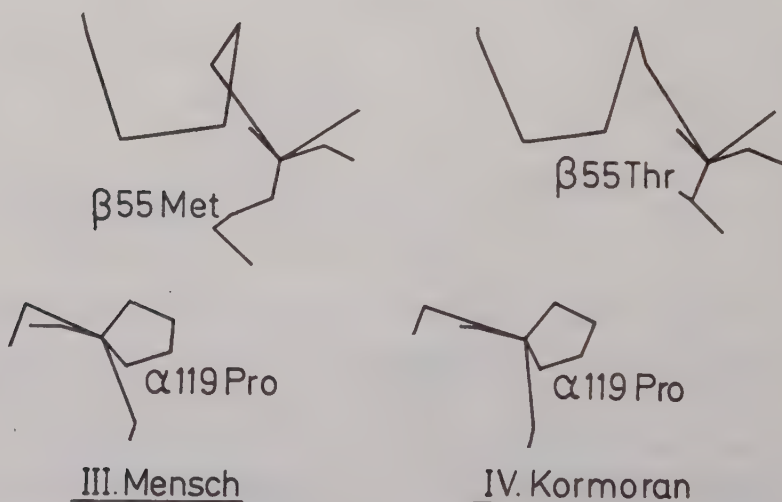


Abb. III. + IV.

Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstelle α 119 $\leftrightarrow$ β 55 des Hb A des Menschen (III) und Hb A und D des Kormorans (IV). Anstelle des β 55 Met des humanen Hämoglobins tritt bei den Vögeln Leu beziehungsweise Ile auf, was aber für die Bindungsstelle ohne Bedeutung ist. Beim Hämoglobin des Kormorans wird durch β 55 Thr die hydrophobe Wechselwirkung auf Grund des vergrößerten Abstandes der Seitenketten unterbrochen.

Dem Austausch einer Phosphatbindungsstelle in den β -Ketten des Kormorans - β 135 A(Hu) $\rightarrow$ G - kommt wohl die größte Bedeutung für die Eigenschaften des Kormoranhämoglobins zu. Zu verstehen ist diese Bedeutung aber nur aus dem Vergleich der Sequenz des Kormorans mit denen der anderen Vögel. An der Position β 135 tritt bei allen bis jetzt sequenzierten Vögeln (nach Kleinschmidt & Sgouros 1987) ein Arginin auf, welches nach Perutz (1983) als zusätzliche Phosphatbindungsstelle gilt und durch seine positive Ladung zur Neutralisation der negativen Ladungen des IPP's beiträgt. Glycin dagegen ist die kürzeste aller Aminosäuren und unpolar, kann also - ebenso wie das Alanin im Humanhämoglobin - nicht zur Wechselwirkung mit dem Phosphat beitragen. Die Folge ist eine im Vergleich zu den anderen Vögeln verschlechterte Phosphatbindung; die Sauerstoffaffinität des Kormoranhämoglobins dürfte daher gesteigert sein.

Abb.V.+VI.

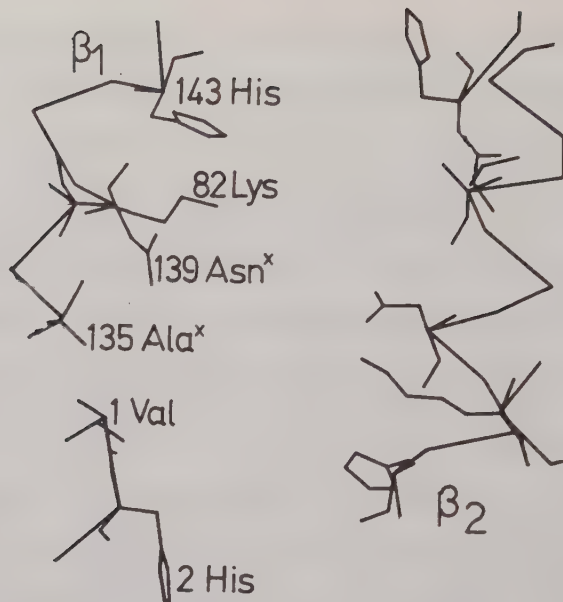
Graphische Darstellung der Phosphatbindungstasche der β - Ketten der Hämoglobine des Menschen (V) und der Vögel (VI).

Nicht berücksichtigt wurde, daß β 143 His bei allen Vögeln gegen Arg ausgetauscht ist. (Weitere Besonderheiten der Phosphatbindungstasche der Hämoglobine der Vögel siehe Tab IV, S.67.)

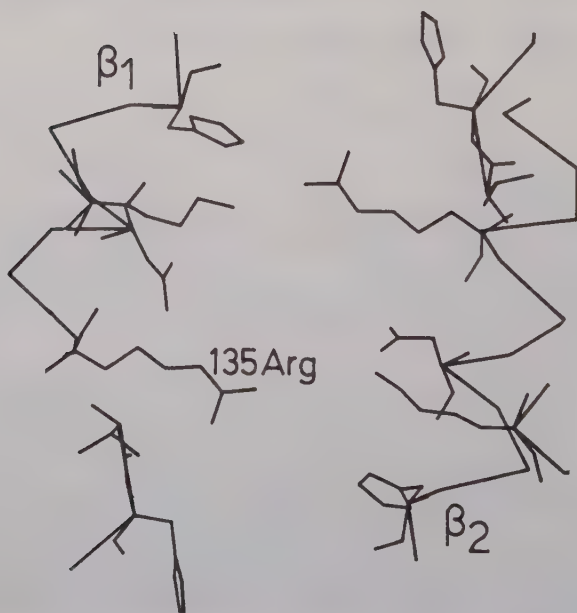
In Abbildung V. sind die bei den Vögeln zusätzlich auftretenden Phosphatbindungsstellen (x) eingetragen.

β 139 Asn (Hu) ist bei allen Vögeln gegen His (wurde in den Abbildungen nicht berücksichtigt), β 135 Ala gegen Arg (siehe Abbildung VI.) ausgetauscht. Beim Hämoglobin des Kormorans findet man an der Position β 135 anstelle des Arg ein Gly, sodaß diese zusätzliche Phosphatbindungsstelle entfällt.

Da sich β 135 Ala (Hu) und β 135 Gly (Ko) in ihrer Auswirkung entsprechen, wurde auf eine Darstellung der Phosphatbindungstasche des Hämoglobins des Kormorans verzichtet.



V. Mensch



VI. Vögel

5.3.4. Schlußfolgerung

Die in den Übersichten C - E und die später mittels FRODO diskutierten Austausche der Kormoransequenz im Vergleich zur Humansequenz und den anderen Vogelsequenzen zeigen, daß ihre Auswirkungen teils zu einer Stabilisierung, teils zu einer Destabilisierung der Deoxyform führen. Die physiologisch meßbare Sauerstoffaffinität ist also nur aus der Summe aller auftretenden Austauscherwirkungen und anderer Parameter zu erklären. Es ist zum Beispiel noch nicht erwiesen, ob für die Vogelhämoglobine eventuell noch andere Bindungsstellen zum Tragen kommen.

Dagegen zeigt es sich bei den abnormalen Hämoglobinen des Menschen, daß ein Austausch eine signifikante Veränderung der Sauerstoffaffinität zur Folge haben kann. Zu postulieren, ob ein Austausch eine entscheidende Funktion hat, ist meiner Meinung nach nur möglich, wenn dieser Unterschied zwischen Sequenzen einer Familie, wenn nicht einer Gattung auftritt. Bei den Vögeln tritt in der Regel eine Fülle von Austauschen auf, deren Auswirkungen aufeinander noch nicht genügend untersucht sind und die oft nur mit den sehr unterschiedlichen Sequenzen anderer Vogelarten verglichen werden können.

5.3.5. Physiologische Daten

Die Auswirkung des Austausches β 135 R(Vögel) $\rightarrow$ G(Kormoran) (die Phosphatbindungsstellen sind bei allen Vögeln identisch bis auf eine Ausnahme (s.Tab.IV)) müßte durch physiologische Messungen überprüft werden. Bisher ist nur eine Messung der Phosphatwirkung auf das Hämoglobin des Kormorans von Giardina et al. (1985) durchgeführt worden:

Tabelle B:
(0.1 M TrisHCl/0.1 M NaCl; 3 mM Phosphat, pH 7.0, T= 20°C)

	- IP6 mm Hg	+ IP6 mm Hg	ΔP_{50} mm Hg
Huhn	1.1	38	36.9
Truthahn	4.0	32	28.0
Fasan	4.0	25	21.0
Ente	4.0	32	28.0
Taucher	2.5	12	9.5
Kormoran	4.0	20	16.0

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, daß der Phosphateinfluß auf das Kormoranhämoglobin (ΔP_{50}) im Vergleich mit den nicht tauchenden Vögeln wesentlich geringer ist, was mit der an Hand der Sequenz ermittelten verminderten Phosphatbindungsfähigkeit sehr gut zu erklären ist. Auch mit Phosphat ist sichtbar, daß der Kormoran eine höhere Sauerstoffaffinität besitzt als die nicht tauchenden Vögel.

5.4. Anpassung an extreme Umweltbedingungen - TAUCHEN

Die Fähigkeit des Tauchens beruht also nicht auf einer einheitlichen Grundlage. Eine Vielfalt von physiologischen und molekularbiologischen Besonderheiten ermöglicht es diesen Tieren, auch unter hypoxischen Bedingungen zu leben. Neben den physiologischen Anpassungsmechanismen (s.Kap.2.2.) kommt auf molekularer Ebene beim Pinguin der Phosphatkonzentrationswechsel (sinkender Phosphatspiegel) während seiner Entwicklung für seine Tauchfähigkeit zum Tragen; beim Kormoran erweist sich eine Verschlechterung der Phosphatbindungsfähigkeit (durch Austausch einer Aminosäure der Sequenz) für sein Leben im Wasser als nützlich. Beide Vögel zeigen also Regulationsmechanismen auf der Grundlage der Hämoglobin - Phosphat - Wechselwirkung. Ob diese Gesichtspunkte die einzigen sind, die für das Tauchvermögen eine Rolle spielen, bleibt offen.

6. Zusammenfassung

6.1. Die Hämoglobine zweier Tauchvögel

Felsenpinguin (*Eudyptes cretatus*)

Kormoran (*Phalacrocorax carbo*)

Im Blut des Pinguins wurde eine Hämoglobinkomponente gefunden, deren α - und β - Ketten sequenziert wurden. In der Sequenz fanden sich im Vergleich mit den Sequenzen des menschlichen Hämoglobins und der Sequenzen anderer Vögel keine besonderen Eigenheiten, die mit der Tauchfähigkeit des Pinguins in Verbindung stehen könnten. Dennoch zeigt das Hämoglobin des Pinguins in physiologischen Messungen eine deutlich erhöhte Sauerstoffaffinität (P_{50} : 16.2 mm Hg). Eine mögliche Erklärung für diese erhöhte Affinität ist der sinkende Phosphat Spiegel im Laufe der Jugendentwicklung. Im tauchfähigen Alter verfügen die Tiere neben den physiologischen also auch über molekularbiologische Anpassungsmechanismen, die ihnen das Leben unter hypoxischen Bedingungen ermöglichen.

Aus dem Blut des Kormorans wurden zwei Komponenten isoliert und die entsprechenden Ketten (α A, α D, β) sequenziert. Es ergaben sich einige für den Kormoran spezifische Austausche. Der Austausch der Phosphatbindungsstelle β 135 H13 Glycin anstelle des bei allen bisher bekannten Vögeln auftretenden Arginins ist für die Funktion des Hämoglobins am entscheidendsten. Vor allem das Fehlen einer positiven Ladung führt zu einer Schwächung der Phosphatbindung. Die physiologischen Messungen unterstützen diese Schlußfolgerung. Beim Kormoran kommt also ebenso wie beim Pinguin neben den physiologischen Anpassungsmechanismen eine Anpassung auf molekularer Ebene über ein höheraffines Hämoglobin zum Tragen. Interessant ist die Feststellung, das beide Tauchvögel Regulationsmechanismen auf der Basis des Phosphateinflusses entwickelt haben.

6.2. Summary

Bird Hemoglobins

The Primary Structure of the Hemoglobins of

the Adult Rock Hopper Penguin (*Eudyptes crestatatus*)
and
the Adult Cormorant (*Phalacrocorax carbo*)

The Molecular Biology of Diving

Penguin blood contains only one hemoglobin component; the constituent α - and β -chains were sequenced. A comparison of these sequences with those of human hemoglobin as well as other bird hemoglobins did not reveal any properties that could stand in connection to the diving ability of penguin. Nevertheless, physiological measurements on penguin hemoglobin revealed a high oxygen affinity (P_{50} : 16.2 mm Hg). A possible explanation for this property could be the progressively decreasing phosphate levels during early development after hatching. Adult birds possess therefore not only physiological but also molecular adaptation mechanisms that allow them to live under hypoxic conditions.

Two hemoglobin components were isolated from cormorant blood and the constituent chains (α A, α D, β) sequenced. Certain amino acid substitutions specific to cormorant could be detected. The replacement of arginine β 135 H 13, involved in phosphate binding, by glycine, is of great importance for hemoglobin function. This arginine has been found in all other bird hemoglobins examined so far. The lack of a positive charge at this position causes a weaker phosphate binding. Physiological measurements provide support to this conclusion. In both birds therefore, a physiological as well as a molecular adaptation mechanism are present, the latter manifesting itself in the high-oxygen-affinity hemoglobin. Of interest is the finding that both birds have developed regulatory mechanisms based on phosphate.

6.3.

Sumario

HEMOGLOBINA EN AVES BUCEADORAS

La estructura primaria de la hemoglobina
del pingüino (*Eudyptes crestatus*)

y

del cormorán (*Phalacrocorax carbo*)

El buceo desde el punto de vista de la biología molecular

La sangre del pingüino contiene solamente un componente de la hemoglobina, los constituyentes de la cadena α y β fueron secuenciadas. Una comparación de estas secuencias con las de la hemoglobina humana, así como con otras hemoglobinas de aves, no reveló ninguna propiedad que pudiese estar en conexión con la habilidad de bucear del pingüino. Aún así, medidas fisiológicas de la hemoglobina del pingüino revelaron una gran afinidad por el oxígeno (P_{50} 16.2 mm Hg). Una posible explicación de esta propiedad podría ser el progresivo descenso en los niveles de fosfato durante el temprano desarrollo del ave. Las aves adultas poseen por lo tanto mecanismo de adaptación fisiológico, así como también mecanismos moleculares que les permiten vivir bajo condiciones de hipoxia.

Dos componentes de la hemoglobina del cormorán fueron secuenciadas. Se detectaron sustituciones de aminoácidos específicas del cormorán. La sustitución de arginina p 135 (H13) implicada en la unión de fosfato por glicina es de gran importancia para la función de la hemoglobina. Esta arginina ha sido hallada en todas las hemoglobinas de otras aves examinadas. La pérdida de una carga positiva en esta posición origina una unión a fosfato más débil. Medidas fisiológicas apoyan esta conclusión. En ambas aves por lo tanto, están presentes tanto un mecanismo fisiológico como molecular de adaptación; este último se manifiesta por la alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. De interés es el hallazgo de que ambas aves han desarrollado mecanismos reguladores basados en el fosfato.

LITERATUR

- Andersen, H.T. (1959)
Depression of Metabolism in the Duck during
Experimental Diving
Acta Physiol.Scand. 46, 234-239
- Andersen, H.T. (1959)
A Note on the Composition of Alveolar Air in the
Diving Duck
Acta Physiol.Scand. 46, 240-243
- Andersen, H.T. (1961)
Physiological Adjustments to Prolonged Diving
in the American Alligator
Acta Physiol.Scand. 53, 23-45
- Andersen, H.T.; Lovo, A. (1964)
The Effect of Carbon Dioxide on the Respiration
of Avian Divers
Comp.Biochem.Physiol. 12, 451-456
- Andersen, H.T. (1966)
Physiological Adaptations in Diving Vertebrates
Physiol.Rev. 46(2), 212-243
- Andersen, H.T.; Lovo, A. (1967)
Cardiovascular Adaptations in Diving Mammals
Am.Heart J. 74, 295-298
- Bartels, H.; Hiller G.; Reinhardt W. (1966)
Oxygen Affinity of Chicken Blood before
and after Hatching
Resp.Physiol. 1, 345 - 356
- Baumann R.; Goldbach E.; Haller E.A.; Wright P.G. (1984)
Organic Phosphates Increase the Solubility of
Avian Hämoglobin D and Embryonic Chicken
Hämoglobin
Biochem.J. 217, 767 - 771
- Begg G.; Rücknagel P.; Godovac - Zimmermann J.;
Braunitzer G.; Schuster W. (1986)
A Non-Commercial Gas Phase Sequenator: Experiences
and Aspekts
aus Modern Aspects in Protein Chemistry. Third
Conference of the Study Group "Chemical
Analysis of Proteins" of the Gesellschaft für
Biologische Chemie, Heidelberg 1985
Biol.Chem.Hoppe Seyler 367, 81 - 94
- Benesch, R.; Benesch, R.E. (1969)
Intracellular Organic Phosphates as Regulators of
Oxygen Release by Hämoglobin
Nature 221, 618-621

- Borgese, T.A.; Nagel, R.L. (1977)
Differential Effects of 2,3-DPG, ATP and Inositol
Pentaphosphate (IP5) on the Oxygen
Equilibria of Duck Embryonic, Fetal and
Adult Hemoglobins
Comp.Biochem.Physiol. 56A, 539 - 543
- Brauer A.W.; Oman C.L.; Margolis M.N. (1984)
Use of Orthophthalaldehyde to Reduce Background
During Automated Edman Degradation
Anal.Biochem. 137, 134 - 142
- Braunitzer G.; Schrank B. (1970)
3-Dimethylamino-1-propin als Puffersubstanz
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 351, 417
- Braunitzer G.; Schrank B.; Ruhfus A. (1971)
Zur vollständigen automatischen Sequenzanalyse
von Peptiden mit Quadrol
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 352, 1730 - 1732
- Braunitzer G.; Schrank B.; Stanql A.; Scheithauer U.
(1978)
Die Sequenzanalyse des Hämoglobins des Schweines
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 359, 137 - 146
- Braunitzer, G.; Schrank, B.; Stanql, A.; Bauer, C. (1978)
Phosphat/Protein Wechselwirkung und die Atmung des
Lamas, des menschlichen Fötus und des Pferdes
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 359, 547-558
- Braunitzer G.; Godovac J. (1982)
The Amino Acid Sequence of Pheasant
(Phasianus colchicus colchicus)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, 229-238
- Braunitzer G.; Huber F. (1987)
Chemistry of Gas Phase Sequencing:
Alternative Bases
Biol.Chem.Hoppe Seyler 368, 195 - 198
- Bunn, H.F.; Forget, B.G. (1986)
Hemoglobin: Molecular, Genetic and
Clinical Aspekts,
W.B.Saunders Company, Philadelphia
- Chothia C.; Lesk A.M. (1986)
The Relation between the Divergence of
Sequence and Structure in Proteins
The Embo Journal 5(4), 823 - 826
- Chothia C.; Lesk A.M. (1986)
The Response of Protein Structures to Amino-Acid
Sequence Changes
Phil.Trans.R.Soc.London A 317, 345 - 356

Davis, B.J. (1964)

Disk Electrophoresis - II
Method and Application to Human Serum Proteins
Am.N.Y. Acad.Sci. 121, 404 - 427

Dickerson, K.; Geis, I. (1983)

Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology
The Benjamin/Cummings Publishing Company,
Menlo Park

Duppel W. (1985)

The FPLC-System for Fast and High Resolution Separation of Proteins
Modern Methods in Prot.Chem. 2, 125 - 153

Edman P.; Begg G. (1967)

A Protein Sequenator
Eur.J.Biochem. 1, 80 - 91

Fermi G.; Perutz M.F.; Shaanan B.; Fourme R. (1984)

The Crystal Structure of Human Deoxyhaemoglobin at 1.74 Å Resolution
J.Mol.Biol. 175, 159 - 174

Fisher J.; Peterson R.T. (1972)

Das bunte Buch der Vögel
BLV Verlagsgesellschaft mbH, München
Kap.3, 73 - 87

Gersonde, K.; Ganguly, T. (1986)

Inositol Phosphates as Modulators of Oxygen Affinity in Hemoglobin
Phytic acid: Chemistry and Applications
von E. Graf, Pilatus Press, Minneapolis

Giardina B.; Corda M.; Pellegrini M.G.; Condo S.G.; Brunori M. (1985)

Functional Properties of the Hemoglobin System of Two Diving Birds
(Podiceps nigricollis and Phalacrocorax carbo)
Mol.Physiol.7, 281 - 292

Guidotti, G.; Hill R.J.; Konigsberg W. (1962)

Structure of Human Hemoglobin,
II. Separation and Amino Acid Composition of the Tryptic Peptides from the α and β Chains
J.Biol.Chem. 237, 2184-2195

Heath, D.; Williams, D.R. (1981)

Man at High Altitude: The Pathophysiology of Acclimatisation and Adaptation
Churchill Livingstone, Edinburgh; 2.Auflage

- Hirs C.W.H. (1956)
The Oxidation of Ribonuclease with Performic Acid
J.Biol.Chem. 219, 611 - 621
- Hirs C.W.H. (1967)
Methods in Enzymology, Vol.XI, Enzyme Structure
New York, 988 ff.
- Honig, G.R.; Adams III, J.G. (1986)
Human Hemoglobin Genetics,
Springer Verlag Wien, Kap.3E, 66-71
- Hunkapiller M.W.; Hewick R.M.; Dreyer W.J.; Hood L.E.
(1983)
High-Sensitivity Sequencing with a Gas-Phase
Sequenator
Methods Enzymol. 91, 399 - 413
- Irving, L. (1939)
Respiration in Diving Mammals
Physiol.Rev. 19, 112-134
- Jauregui - Adell J.; Marti J. (1975)
Acidic Cleavage of the Aspartyl-Proline Bond and
the Limitations of the Reaction
Anal.Biochem. 69, 468 - 473
- Johansen K.; Lenfant C. (1972)
A Comparative Approach to the Adaptability of
O₂-Hb Affinity
in The 4th Alfred Benson Symposium: O₂-Affinity
of Hemoglobin and Red Cell Acid Base Status von
P. Astrup; M. Rorth,
Munksgaard, Copenhagen, 750 - 780
- Jones T.A. (1985)
Interactive Computer Graphics: FRODO
Methods Enzymol. 115, 157 - 171
- Kleinschmidt T.; Sqouros J.G. (1987)
Hemoglobin Sequences
Biol.Chem.Hoppe-Seyler 368, 579 - 615
- Kooyman, G.L.; Andersen, H.T. (1969)
Deep Diving
aus Biology of Marine Mammals, von
H. Anderson, Academ. Press N.Y. Chap.3, 65-94
- Kratzin H.;Yang C.;Krusche J.U.;Hilschmann N.(1980)
Präparative Auftrennung des tryptischen
Hydrolysates eines Proteins mit Hilfe der
Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 361, 1591 - 1598
- Lenfant, Cl. (1969)
Physiological Properties of Blood of
Marine Mammals
aus Biology of Marine Mammals von
H. Anderson, Academ.Press N.Y. Chap.4, 95-116

- Lenfant C.; Kooyman G.L.; Ebner R.; Drabek C.M. (1969)
Respiratory Function of Blood of the
Adelie Penguin (*Pygoscelis adeliae*)
Americ.J.Phys. 216(6), 1598 - 1600
- Lottspeich F. (1980)
Identification of the Phenylhydantoin Derivatives
of Amino Acids by High Pressure Liquid Chromato-
graphy Using a Ternary, Isocratic Solvent System
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 361, 1829 - 1834
- Mehner A.; Hartfiel W. (1983)
Blut, Blutbildung und Blutkreislauf
aus Handbuch der Geflügelphysiologie Teil I
S.Karger Verlag, Basel Kap.1, 280 - 305
- Oberthür W.; Braunitzer G.; Baumann R.; Wright P.G. (1983)
Die Primärstruktur der α - und β -Ketten
der Hämoglobine des Straußes (*Struthio camelus*)
und des Nandu (*Rhea americana*) (*Struthioformes*)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, 119-134
- Oberthür W.; Braunitzer G. (1984)
Hämoglobine vom Gemeinen Star (*Sturnus vulgaris*,
Passeriformes). Die Primärstrukturen der α A,
 α D und β -Ketten
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 365, 159-173
- Oberthür W.; Godovac-Zimmermann J.; Braunitzer G. (1984)
The Different Evolution of Bird Hemoglobin Chains
aus Brussels Hemoglobin Symposium
von A.G. Schnek; C. Paul
Edition de l'Universite de Bruxelles, 365-375
- Perutz M.F.; Rossmann M.G.; Cullis A.F.;
Muirhead H.; Will G.; Worth A.C.T. (1960)
Structure of Haemoglobin
Nature 185, 416
- Perutz M.F.; Muirhead H.; Cose J.M.; Godman L.C.D.
(1968)
Three-Dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxy-
Haemoglobin at 2.8 Å Resolution: The Atomic Model
Nature 219, 131 - 139
- Perutz, M.F. (1969)
The Haemoglobin molecule
Proc.Roy.Soc. B 173, 113-140
- Perutz M.F.; Fermi G. (1981)
2 Hemoglobin and Myoglobin aus Atlas of Molecular
Structures of Biology von D.C. Phillips;
F.M. Richards, Oxford University Press, N.Y.

- Perutz M.F. (1983)
Species Adaption in a Protein Molecule
Mol.Biol.Evol. 1, 1 - 28
- Pfleetschinger J.; Braunitzer G. (1980)
Kovalente, C-terminale Hydrophilisierung von Brom-
cyanpeptiden mit Arginin im Sequenator
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 361, 925 - 931
- Rossi - Fanelli A.; Antonini E.; Caputo A. (1958)
Studies on the Structure of Hemoglobin
I. Physicochemical Properties of Human Globin
Biochim.Biophys.Acta 30, 608 - 615
- Rovera G.; Magarian C.; Borun T.W. (1978)
Resolution of Hemoglobin Subunits by
Electrophoresis in Acid Urea Polyacrylamid
Gels Containing Triton X-100
Anal.Biochem. 85, 506 - 518
- Russu, I.M.; Chien Ho (1986)
Assessment of Roles of β 146 Histidyl and other
Histidyl Residues in the Bohr Effect of Human
Normal Adult Hemoglobin
Biochemistry 25, 1706-1716
- Saha A.; Gosh J. (1965)
Comparative Studies on Avian Hemoglobins
Comp.Biochem.Physiol. 15, 217 - 235
- Schneegans D.; Braunitzer G.; Oberthür W.; Kösters J.;
Grimm F. (1985)
Die Hämoglobine des Feldsperlings (Passer
montanus). Die Sequenz der Haupt-(Hb A) und
Nebenkomponente (Hb D).
Biol.Chem.Hoppe-Seyler 366, 893-899
- Schnek A.G.; Paul C.; Vandecasserie C. (1978)
Respiratory Proteins in Birds
aus Chemical Zoology von M.Florkin; B.T.Scheer,
Academic Press, N.Y., Vol.10,10, 359 - 381
- Scholander, P.F. (1940)
Experimental Investigations on the Respiratory
Function in Diving Mammals and Birds
Hvalradets Skrifter Norske Videnskaps - Akademie
Oslo 22, 5-121
- Spackman D.H.; Stein W.H.; Moore S. (1958)
Automatic Recording Apparatus for Use in the
Chromatography of Amino Acids
Anal.Chem. 30, 1190 - 1206

Stonehouse B. (1976)

Die Pinguine
aus Grzimek's Tierleben
von B. Grzimek, Kindler Verlag, Zürich
Bd.7(I), Kap.5, 117 - 132

Stryer, L. (1983)

Biochemie /2. Auflage,
Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden,
Kap.3 + 4, 36-66

Vandecasserie C.; Paul C.; Schnek A.G.; Leonis J. (1973)

Oxygen Affinity of Avian Hemoglobins
Comp.Biochem.Physiol. 44A, 711 - 718

Van Tets, G.F. (1976)

Die Ruderfüßer
aus Grzimek's Tierleben
von B.Grzimek, Kindler Verlag, Zürich
Bd.I, Kap.7, 155 - 177

Washburn K.W. (1968)

Effects of Age of Bird and Hemoglobin Type on
Concentration of Adult Hemoglobin
Poultry Science 47, 1083 - 1089

Wolters H.E. (1975 - 1982)

Die Vogelarten der Erde
Paul Parey Verlag, Berlin - Hamburg

Zimmerman C.L.; Pisano J.J. (1977)

High Performance Liquid-Chromatography of Amino
Acid Derivatives
Methods Enzymol. 47, 45 - 51

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr.G. Braunitzer am Max-Planck-Institut für Biochemie von Oktober 1985 bis Oktober 1987 durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.G.Braunitzer danke ich für die großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof.Dr.J.Kösters danke ich für die Bereitstellung des Vogelblutes und die wertvolle Beratung meiner Arbeit.

Frau Dr.T.Kleinschmidt danke ich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Herrn Dr.D.Schneeganß danke ich für die Einführung in die proteinchemischen Arbeitsmethoden.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Proteinchemie möchte ich mich herzlich für die entgegengebrachte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Lebenslauf

Korinna Huber geb. Mannheim

- 7.7.1960 geboren als Tochter von Dr.med. Walter Mannheim
und Ehefrau Anna Barbara Mannheim
in Heidelberg
- 16.4.1987 Eheschließung mit Dipl.Chem. Felix Huber
aus Bad Tölz

Ausbildung

- 1967-1970 Besuch der Grundschule in Marburg
- 1970-1979 Besuch des humanistischen Gymnasiums in Marburg
- 13.6.1979 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
- 1979-1985 Studium der Veterinärmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Giessen
- 25.6.1985 Staatsexamen (JLU Giessen)

Seit

- Oktober 1985 Arbeit an der vorliegenden Dissertation am
Max-Planck-Institut für Biochemie in
Martinsried bei München, Abt. Proteinchemie,
Leitung: Prof.Dr.G. Braunitzer

